



RC/FR 2004/000354

27 FEV. 2004

REC'D 28 MAY 2004

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 29 JAN. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 2002

| | | |
|---|--------------|------------------|
| REMISE DES PIÈCES | | Réserve à l'INPI |
| DATE | 6 NOV 2003 | |
| LIEU | 69 INPI LYON | |
| N° D'ENREGISTREMENT | 0313054 | |
| NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI | | |
| DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI | 06 NOV. 2003 | |
| Vos références pour ce dossier (facultatif) 241010 D21767 FT | | |

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE
Cabinet REGIMBEAU
129, rue Servient
69326 LYON CEDEX 03
FRANCE

| | | |
|---|--|--|
| Confirmation d'un dépôt par télécopie | | <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie |
| 2. NATURE DE LA DEMANDE | | |
| Demande de brevet | | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Demande de certificat d'utilité | | <input type="checkbox"/> |
| Demande divisionnaire | | <input type="checkbox"/> |
| Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale | | N° _____ Date _____ |
| Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale | | N° _____ Date _____ |
| | | N° _____ Date _____ |
| 3. TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) | | |
| Procédé de préparation de microorganismes évolués permettant la création ou la modification de voies métaboliques | | |

| | | |
|---|----------------------|---|
| 4. DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE | | Pays ou organisation Date _____ N° _____ |
| | | Pays ou organisation Date _____ N° _____ |
| | | Pays ou organisation Date _____ N° _____ |
| | | <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite » |
| 5. DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases) | | |
| Nom ou dénomination sociale | | <input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique |
| Prénoms | | METABOLIC EXPLORER |
| Forme juridique | | |
| N° SIREN | | 423703107 |
| Code APE-NAF | | |
| Domicile ou siège | Rue | BIOPOLE CLERMONT-LIMAGNE 63360 SAINT BEAUZIRE FRANCE |
| | Code postal et ville | |
| | Pays | FRANCE Française |
| Nationalité | | N° de télécopie (facultatif) |
| N° de téléphone (facultatif) | | |
| Adresse électronique (facultatif) | | <input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite » |

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

Réserve à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE **6 NOV 2003**

LIEU **69 INPI LYON**

N° D'ENREGISTREMENT **0313054**

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 2003

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)

| | | |
|--|----------------------|---------------------|
| Nom | 241010 D21767 FT | |
| Prénom | | |
| Cabinet ou Société | Cabinet REGIMBEAU | |
| N ° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel | | |
| Adresse | Rue | 129, rue Servient |
| | Code postal et ville | 69326 LYON CEDEX 03 |
| | Pays | |
| N° de téléphone (facultatif) | 04 26 84 34 40 | |
| N° de télécopie (facultatif) | 04 26 84 34 49 | |
| Adresse électronique (facultatif) | lyon@regimbeau.fr | |

7 INVENTEUR (S)

| | |
|---|---|
| Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes | <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s) |
|---|---|

8 RAPPORT DE RECHERCHE

| | |
|---|---|
| Établissement immédiat ou établissement différé | <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
|---|---|

| | |
|---|--|
| Paiement échelonné de la redevance (en deux versements) | Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non |
|---|--|

9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

| |
|--|
| Uniquement pour les personnes physiques |
| <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) |
| <input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la déclaration d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG |

10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS

| |
|---|
| <input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences |
|---|

Le support électronique de données est joint

La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe

Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes

11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)

François Tétaz
CPI 04-1103

VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI

F. Tétaz

beur

La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation de microorganismes évolués permettant la création ou la modification de voies métaboliques, les souches de microorganismes évolués ainsi obtenus, les gènes évolués codant pour des protéines évoluées susceptibles d'être obtenues par le 5 procédé selon l'invention et l'utilisation desdits microorganismes, gènes ou protéines évolués dans un procédé de biotransformation.

La préparation de microorganismes à propriétés modifiées est un processus largement répandu. Il s'agit soit de faire évoluer des microorganismes en les faisant croître sur un milieu de croissance avec un élément de pression de sélection, de 10 manière à sélectionner les microorganismes capables de résister à cette pression, soit à introduire un ou plusieurs gènes hétérologues par des techniques aujourd'hui largement répandues de génie génétique, afin de conférer aux microorganismes des nouveaux caractères phénotypiques associés à l'expression du ou desdits gènes hétérologues. L'évolution peut être favorisée par l'utilisation d'agents mutagènes 15 bien connus de l'homme du métier.

Des techniques d'évolution par croissance sous pression de sélection en supprimant un gène nécessaire à la transformation d'un composant présent dans le milieu de culture et au moyen d'un agent mutagène sont décrites notamment dans FR 2 823 219 ou WO 03/004656.

20 **Brève description de l'invention**

La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation de microorganismes évolués, permettant une modification des voies métaboliques, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

25 a) Modification des cellules d'un microorganisme initial de manière à inhiber la production ou la consommation d'un métabolite lorsque le microorganisme est cultivé sur un milieu défini, affectant ainsi la capacité de croissance du microorganisme. En l'absence de modification des cellules, le microorganisme est capable de produire ou de consommer ce métabolite et présente une croissance normale lorsque cultivé sur ce 30 même milieu défini.

- b) Culture des microorganismes modifiés précédemment obtenus sur ledit milieu défini pour le faire évoluer, le milieu défini pouvant également comprendre un co-substrat nécessaire à cette évolution,
- c) Sélection des cellules de microorganismes modifiés capables de se développer sur le milieu défini, éventuellement avec un co-substrat.

5 Le microorganisme évolué comprend préférentiellement au moins un gène évolué, codant pour une protéine évoluée, dont l'évolution permet de remplacer la voie métabolique inhibée par une nouvelle voie métabolique.

La présente invention concerne également un procédé comprenant une étape 10 supplémentaire a1) d'introduction d'au moins un gène hétérologue codant pour une protéine hétérologue, ledit gène hétérologue étant destiné à faire évoluer une nouvelle voie métabolique, préalable à l'étape b) de culture des microorganismes modifiés.

La présente invention concerne aussi un procédé comprenant une étape d) 15 d'isolation du gène évolué codant pour ladite protéine évoluée.

La présente invention concerne aussi un procédé selon l'invention dans lequel on introduit le gène évolué précédemment obtenu, sous une forme appropriée, dans un microorganisme de production destiné à la production de protéine évoluée.

L'invention concerne également un microorganisme évolué susceptible d'être 20 obtenu par un procédé selon l'invention tel que défini ci-dessus et ci-après.

L'invention concerne aussi un procédé de préparation d'une protéine évoluée, caractérisé en ce que l'on cultive un microorganisme évolué selon l'invention dans un milieu de culture approprié pour la production de la protéine évoluée, la protéine évoluée produite étant éventuellement purifiée.

25 L'invention concerne aussi un gène évolué codant pour une protéine évoluée susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention tel que défini ci-dessus et ci-après.

L'invention concerne également une protéine évoluée susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention tel que défini ci-dessus et ci-après.

30 L'invention concerne également l'utilisation d'un microorganisme évolué ou une protéine évoluée tels que définis ci-dessus et ci-après dans un procédé de biotransformation.

Définitions

Par « microorganisme évolué », on entend selon l'invention un microorganisme obtenu par sélection d'un microorganisme modifié. Le microorganisme évolué présente au moins une différence par rapport au 5 microorganisme modifié, cette différence correspond par exemple à une amélioration d'une caractéristique enzymatique ou encore à la création d'une nouvelle voie métabolique.

Par « voie métabolique », on entend selon l'invention une ou plusieurs réactions enzymatiques dont la succession permet de produire une molécule (produit) 10 différente de la molécule initiale (substrat).

Par « modification », on entend selon l'invention une altération, en particulier une délétion, d'au moins un gène et/ou de sa séquence promotrice, le gène codant pour une enzyme.

Par « métabolite », on entend selon l'invention une molécule synthétisée 15 et/ou transformée par le microorganisme.

Par « milieu défini », on entend selon l'invention un milieu de composition moléculaire connue, adapté à la croissance du microorganisme. Le milieu défini est substantiellement exempt du ou des métabolites dont on inhibe la production en réalisant la modification.

20 Par « co-substrat », on entend selon l'invention une molécule carbonée ou non, différente du substrat, qui est impliqué dans une réaction et donnant un ou plusieurs atomes au substrat afin de former le produit. Le co-substrat n'a pas de propriété mutagène reconnue.

Par « sélection », on entend selon l'invention un procédé de culture 25 permettant de sélectionner les microorganismes ayant évolué de telle sorte que la modification n'affecte plus la croissance. Une application préférée est un procédé de culture en continu, conduit en appliquant des taux de dilution croissants de telle sorte de ne conserver dans le milieu de culture que les microorganismes ayant un taux de croissance égal ou supérieur au taux de dilution imposé.

30 Par « gène évolué », on entend selon l'invention une succession d'acides nucléiques (pris parmi A,T,G ou C) délimité par un codon stop (UAA, UAG, UGA) en phase et ayant, à l'issue de la sélection, au moins un acide nucléique différent par

rapport à la séquence initiale de telle sorte que la protéine codée par ce gène évolué présente au moins un acide aminé différent par rapport à la protéine codée par le gène initial.

Par « gène hétérologue », on entend selon l'invention une succession d'acides nucléiques, délimitée par un codon start (ATG ou GTG) et un codon stop (UAA, 5 UAG, UGA) en phase, dénommée séquence codante et issue d'un organisme différent de celui utilisé pour réaliser l'évolution et/ou la production.

Par « protéine évoluée », on entend selon l'invention une succession d'acides aminés (séquence protéique) ayant, à l'issue de la sélection, au moins un acide aminé 10 différent par rapport à la séquence protéique initiale.

Par « protéine hétérologue », on entend selon l'invention une protéine issue de la traduction d'un gène hétérologue.

Les gènes et protéines peuvent être identifiées par leurs séquences primaires, mais également par homologies de séquences ou alignements qui définissent des 15 groupes de protéines.

Les PFAM (Protein families database of alignments and Hidden Markov Models ; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) représentent une large collection d'alignements de séquences protéiques. Chaque PFAM permet de visualiser des alignements multiples, de voir des domaines protéiques, d'évaluer la répartition entre 20 les organismes, d'avoir accès à d'autres bases de données, de visualiser des structures connues de protéines.

Les COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) sont obtenus en comparant les séquences protéiques issus de 43 génomes complètement séquencés représentant 30 lignées 25 phylogénétiques majeurs. Chaque COG est défini à partir d'au moins trois lignées ce qui permet ainsi d'identifier des domaines conservés anciens.

Les moyens d'identification des séquences homologues et de leurs pourcentages d'homologie sont bien connus de l'homme du métier, comprenant notamment les programmes BLAST qui peuvent être utilisé à partir du site 30 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> avec les paramètres indiqués par défaut sur ce site. Les séquences obtenues peuvent alors être exploitées (e.g. alignées) en utilisant par exemple les programmes CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) ou

MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>), avec les paramètres indiqués par défaut sur ces sites.

En utilisant les références données sur GenBank pour les gènes qui sont connus, l'homme du métier est capable de déterminer les gènes équivalents dans d'autres organismes, souches bactériennes, levures, champignons, mammifères, plantes, etc. Ce travail de routine est avantageusement effectué en utilisant les séquences consensus pouvant être déterminées en réalisant des alignements de séquences avec des gènes issus d'autres microorganismes, et en dessinant des sondes dégénérées permettant de cloner le gène correspondant dans un autre organisme. Ces techniques de routine de biologie moléculaire sont bien connues dans l'art et sont décrites par exemple dans Sambrook et al. (1989 Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.).

Les gènes susceptibles d'être déletés ou surexprimés pour les souches évoluées selon l'invention sont définis principalement par l'emploi de la dénomination du gène de *E. coli*. Cependant, cet emploi a une signification plus générale selon l'invention et englobe les gènes correspondants d'autres microorganismes. En effet en utilisant les références GenBank des gènes d'*E. coli*, l'homme du métier est capable de déterminer les gènes équivalents dans d'autres souches bactériennes qu'*E. coli*.

Par « nouvelle voie métabolique », on entend selon l'invention une ou plusieurs réactions enzymatiques, dont la succession permet de produire une molécule, qui, après l'étape de sélection du microorganisme évolué, se révèlent différentes des activités enzymatiques du microorganisme non évolué. La différence pouvant résider dans le type de réaction catalysée ou bien dans ses caractéristiques cinétiques (K_m, V_{max}, K_i, ...). Une nouvelle voie enzymatique permet de produire une molécule, différente ou non du produit initial, à partir d'un substrat différent ou non du substrat initial.

Par « forme appropriée », on entend selon l'invention une succession d'acide nucléique, délimitée par un codon start (ATG ou GTG) et un codon stop (UAA, UAG, UGA) en phase, dénommée séquence codante, ou une partie de cette séquence codante, sous le contrôle d'éléments de régulation nécessaires à son expression dans le microorganisme dans lequel le gène hétérologue sera exprimé.

Ces éléments de régulations sont bien connus de l'homme du métier, et comprennent des séquences de régulation promotrice, ou promoteurs, en particulier des promoteurs dits promoteurs forts constitutifs chez les microorganismes. De préférence, le promoteur constitutif est choisi parmi pTAC-O, pLAC-O, pTRC-O, 5 des promoteurs forts pour lesquels l'opérateur lac a été déléte pour les rendre constitutifs, pTHLA.

Par « microorganisme initial » on entend un microorganisme avant réalisation de toute modification, mutation ou évolution.

Par « microorganisme de production », on entend selon l'invention un 10 microorganisme évolué ou un microorganisme optimisé dans le lequel a été introduit la nouvelle voie métabolique issue d'un microorganisme évolué.

Par « microorganisme modifié » on entend un microorganisme obtenu après 15 réalisation de modifications maîtrisées par l'homme et ne résultant pas d'un processus d'évolution. On citera à titre d'exemple de modification, la mutation dirigée ou la délétion d'un gène, la modification dirigée d'un promoteur.

Par « milieu de culture approprié pour la production de la protéine évoluée », on entend selon l'invention soit un milieu de composition défini, soit un milieu complexe, soit un milieu partiellement défini. Le milieu complexe est réalisé à partir 20 soit d'un hydrolysat végétal, de microorganisme ou animal ; sa composition peut-être connue en réalisant des analyses, il est cependant rare de pouvoir réaliser une analyse exhaustive de ce type de milieu. Un milieu partiellement défini est un milieu défini auquel on rajoute un milieu complexe.

Par « procédé de biotransformation » on entend selon l'invention un procédé de transformation d'une molécule A en une molécule B en utilisant une ou plusieurs 25 enzymes, contenues ou non dans un ou plusieurs microorganismes. On distingue trois types de procédés de biotransformation : la bioconversion, la fermentation et la biocatalyse. Dans le cas de la bioconversion, la ou les enzymes sont contenues dans un ou plusieurs microorganismes, ceux-ci sont cultivés sur un milieu approprié puis la molécule A et éventuellement un ou plusieurs co-subs-trats sont apportés pour être 30 transformés en B. Dans le cas de la fermentation, la ou les enzymes sont contenues dans un ou plusieurs microorganismes, ceux-ci sont cultivés sur un milieu approprié permettant au(x) microorganisme de synthétiser la molécule A ; le milieu approprié

peut contenir des co-substrats. Dans le cas de la biocatalyse, la ou les enzymes ne sont pas contenues dans des cellules mais sont entourées par un milieu adéquat apportant la molécule A ainsi que les co-substrats nécessaires à la biotransformation.

Les méthodes d'isolation de gènes sont bien connues de l'homme du métier,

5 décrives notamment dans Sambrook *et al.* (1989 Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York), Ausubel et al., 1987 (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York); Maniatis et al., 1982, (Molecular Cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Sring Harbor, New York). Ces méthodes permettent de

10 localiser, de copier ou d'extraire le gène, afin de l'introduire dans un nouvel organisme. Cette dernière étape pouvant être précédée d'une étape d'incorporation du gène dans un polynucléotides préalablement à son introduction dans le microorganisme.

Les méthodes de purification d'une protéine sont bien connues de l'homme du métier, décrives notamment dans Coligan *et al.*, 1997 (Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, Inc). Elles permettent d'identifier la protéine recherchée dans un extrait protéique, fractionné ou non. La protéine peut ensuite être purifiée, ce qui se traduit par une augmentation de son activité spécifique, dans le cas particulier d'une enzyme. Enfin ces techniques permettent éventuellement 20 d'immobiliser la protéine sur un support (e.g. résine).

Par « délétion », on entend selon l'invention une suppression de l'activité du gène « déléte ». Cette suppression peut être une inactivation du produit d'expression du gène concerné par un moyen approprié, ou bien l'inhibition de l'expression du gène concerné, ou encore la délétion d'au moins une partie du gène concerné de 25 manière soit que son expression n'ait pas lieu (par exemple délétion d'une partie ou de l'ensemble de la région promotrice nécessaire à son expression) soit que le produit d'expression ait perdu sa fonction (par exemple délétion dans la partie codante du gène concerné). De manière préférentielle, la délétion d'un gène comprend la suppression de l'essentiel dudit gène, et le cas échéant son remplacement par un gène 30 marqueur de sélection permettant de faciliter l'identification, l'isolement et la purification des souches évoluées selon l'invention.

Par « substrat » on entend un métabolite qui peut être transformé par l'action d'une enzyme, éventuellement en présence d'un co-substrat.

Description détaillée de l'invention

A. Microorganismes modifiés

5 Les souches de microorganismes modifiés selon l'invention peuvent être procaryotiques ou eucaryotiques.

Par souche de microorganismes, on entend selon l'invention un ensemble de microorganismes d'une même espèce comprenant au moins un microorganisme de ladite espèce. Ainsi, les caractéristiques décrites pour la souche s'appliquent à 10 chacun des microorganismes de ladite souche. De même, les caractéristiques décrites pour l'un des microorganismes de la souche s'appliqueront à l'ensemble desdits microorganismes la composant.

Les microorganismes optimisés selon l'invention sont choisis parmi les bactéries, les levures et les champignons, et notamment ceux des espèces suivantes : 15 *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Escherichia sp.*, *Gluconobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Streptomyces sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Candida sp.*

Dans un mode de réalisation préféré, la souche bactérienne est une souche d'*Escherichia*, en particulier d'*E. coli*. Dans un autre mode de réalisation, la souche bactérienne est une souche de *Corynebacterium*, en particulier *C. glutamicum*. 20

Dans un autre mode de réalisation, la souche de levure est une souche de *Saccharomyces*, en particulier *S. cerevisiae*

Pour préparer lesdit microorganismes modifiés, il peut être avantageux d'atténuer, en particulier de déléter, d'autres gènes associés ou non à la voie métabolique à modifier afin de favoriser l'évolution du microorganisme. 25

Pour préparer lesdit microorganismes modifiés, il peut être également avantageux de favoriser, en particulier de surexprimer, d'autres gènes, hétérologues ou non, associés ou non à la voie métabolique à modifier afin de favoriser l'évolution du microorganisme.

30 La surexpression d'un gène peut être effectuée par changement du promoteur de ce gène *in situ*, par un promoteur fort ou inductible. De façon alternative, on

introduit, dans la cellule, un plasmide réplicatif (simple ou multicopies) dans lequel le gène que l'on désire surexprimer est sous le contrôle du promoteur adéquat.

De telles modifications seront décidées au cas par cas selon le choix de la voie métabolique à modifier. Elles sont notamment décrites au cas par cas pour les 5 voies métaboliques particulières exposées ci-après.

L'homme du métier connaît les protocoles permettant de modifier le caractère génétique de microorganismes.

L'inactivation d'un gène se fait préférentiellement par recombinaison homologue. (Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of 10 chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645). Le principe d'un protocole en est rappelé brièvement : on introduit dans la cellule un fragment linéaire, obtenu *in vitro*, comprenant les deux régions flanquant le gène, et au moins un gène de sélection entre ces deux régions (généralement un gène de résistance à un antibiotique), ledit fragment linéaire 15 présentant donc un gène inactivé. On sélectionne les cellules ayant subi un événement de recombinaison et ayant intégré le fragment introduit par étalement sur milieu sélectif. On sélectionne ensuite les cellules ayant subi un événement de double recombinaison, dans lesquelles le gène natif a été remplacé par le gène inactivé. Ce protocole peut être amélioré en utilisant des systèmes de sélections positive et 20 négative, afin d'accélérer la détection des événements de double recombinaisons.

L'inactivation d'un gène chez *S. cerevisiae* se fait préférentiellement par recombinaison homologue (Baudin *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 21, 3329-3330, 1993; Wach *et al.*, *Yeast* 10, 1793-1808, 1994; Brachmann *et al.*, *Yeast*, 14 :115-32, 1998).

B. Microorganismes de production

25 Les microorganismes de productions sont choisis également parmi les bactéries, les levures et les champignons définis précédemment. Il peut s'agir des microorganismes évolués obtenus par le procédé d'évolution selon l'invention, ou encore de microorganismes optimisés pour la production du métabolite recherché, dans lesquels on aura introduit au moins un gène évolué selon l'invention.

30 **C. Culture des Microorganismes**

Selon l'invention, les termes « culture » et « fermentation » sont employés indifféremment pour désigner la croissance du microorganisme sur un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple.

Par source de carbone simple, selon la présente invention, on entend des sources de carbone utilisables par l'homme du métier pour la croissance normale d'un microorganisme, d'une bactérie en particulier. On entend désigner notamment les différents sucres assimilables, tels le glucose, le galactose, le saccharose, le lactose ou les mélasses, ou les sous-produits de ces sucres. Une source de carbone simple tout particulièrement préférée est le glucose. Une autre source de carbone simple préférée est le saccharose.

La définition des conditions de culture des microorganismes selon l'invention est à la portée de l'homme du métier. On fermente notamment les bactéries à une température comprise entre 20°C et 55°C, de préférence entre 25°C et 40°C, plus particulièrement d'environ 30°C pour *C. glutamicum* et d'environ 37°C pour *E. coli*.

La fermentation est généralement conduite en fermenteurs avec un milieu minéral de culture de composition connu défini et adapté en fonction des bactéries utilisées, contenant au moins une source de carbone simple et le cas échéant un co-substrat nécessaire à la production du métabolite.

En particulier, le milieu minéral de culture pour *E. coli* pourra ainsi être de composition identique ou similaire à un milieu M9 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128), un milieu M63 (Miller, 1992 ; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) ou un milieu tel que défini par Schaefer *et al.* (1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96).

De manière analogue, le milieu minéral de culture pour *C. glutamicum* pourra ainsi être de composition identique ou similaire au milieu BMCG (Liebl *et al.*, 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 205-210) à un milieu tel que défini par Riedel *et al.* (2001, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 573-583).

Les voies métaboliques destinées à être évoluées sont généralement choisies parmi les voies de biosynthèse des acides aminés, les voies de synthèse des acides nucléiques, les voies de synthèse des lipides, les voies du métabolisme des sucres.

Selon un premier mode préférentiel de réalisation de l'invention, la voie 5 métabolique évoluée est une voie de biosynthèse des acides aminés, en particulier une voie de biosynthèse d'un acide aminé choisi parmi la méthionine, la cystéine, la thréonine, la lysine, ou l'isoleucine.

Selon un deuxième mode préférentiel de réalisation de l'invention, la voie métabolique modifiée est une voie permettant la régénération du NADP à partir du 10 NADPH. On citera en particulier la voie de biosynthèse de la cystéine, de l'hydroxypropionate et de biosynthèse du xylitol.

D.I. Voie de biosynthèse de la méthionine

L'application de l'invention peut se faire par exemple sur la voie de biosynthèse de la méthionine (figure 1) et permet d'obtenir des souches de 15 microorganismes, en particulier des bactéries, notamment *E. coli* et les corynébactéries, produisant de la méthionine par métabolisme d'une source de carbone simple et d'une source de soufre, en particulier le methylmercaptopan (CH₃SH), le sulfure d'hydrogène (H₂S) ou leurs sels physiologiquement acceptables. La source de soufre H₂S peut aussi être introduite dans le milieu de 20 culture sous la forme de sulfate.

Par sel physiologiquement acceptable, on entend selon l'invention les sels qui n'affectent pas le métabolisme et la capacité de croissance de la souche de microorganisme selon l'invention, notamment les sels de métaux alcalins comme le sodium.

25 L'utilisation d'une source de carbone simple et d'un composé soufré en particulier du methylmercaptopan ou du sulfure d'hydrogène, pour la production de méthionine par bioconversion présente *a priori* plusieurs avantages, notamment :

- la synthèse de la méthionine, en une ou deux étapes à partir d'O-acyl-L-homosérine, devient indépendante de la synthèse de la cystéine voire 30 également du cycle du tétrahydrofolate ;

les composés soufrés, comme le méthyl-mercaptopan, qui sont des matières premières généralement toxiques issues de la pétrochimie, peuvent être valorisés dans la synthèse d'acides aminés à haute valeur ajoutée.

L'invention est basée sur le fait que l'on peut obtenir, de façon dirigée, une 5 modification de l'activité « méthionine-synthase » de la cystationine- γ -synthase (EC 4.2.99.9 ; GenBank AAN83320, ou AAA24167) en présence de méthyl-mercaptopan. Cette enzyme de la voie de biosynthèse de méthionine, codée par le gène *metB* chez *E. coli* (Fig. 2) et *C. glutamicum*, présente une activité pour un large spectre de substrats (Flavin, M. ; Slaughter, C. (1967) Enzymatic synthesis of homoserine or 10 methionine directly from O-succinyl-homoserine. *Biochim. Biophys. Acta* 132: 400-405).

L'invention est aussi basée sur le fait que l'on peut obtenir, de façon dirigée, une modification de l'activité « méthionine-synthase » de l'O-acétyl-L-homosérine sulfhydrolase (ou O-acétyl-L-homosérine sulfhydrylase, C 4.2.99.10) en présence de 15 méthylmercaptopan. Cette enzyme de la voie de biosynthèse de méthionine, codée par le gène *metY* (figure 2) chez *C. glutamicum* (Genbank AF220150), présente une activité pour un large spectre de substrats (Smith IK, Thompson JF. (1969) Utilization of S-methylcysteine and methylmercaptopan by methionineless mutants of 20 Neurospora and the pathway of their conversion to methionine. II. Enzyme studies. *Biochim Biophys Acta* 184(1):130-8).

L'application de l'invention à la modification de la voie de biosynthèse de la méthionine nécessite dans un premier temps de modifier génétiquement la bactérie initiale. La modification implique nécessairement l'atténuation d'au moins un gène et éventuellement le clonage d'au moins un gène hétérologue. L'atténuation du gène 25 doit rendre la bactérie dépendante de la restauration d'une voie métabolique équivalente afin de permettre sa croissance. La bactérie génétiquement modifiée est cultivée et l'on sélectionne la ou les souches bactériennes dont le taux de croissance s'améliore en présence ou non d'un co-substrat exogène.

Dans un mode préféré d'application de l'invention, ladite modification de la 30 souche initiale, notamment *E. coli*, consiste à inactiver l'activité méthionine-synthase native (codée par le gène *metE* chez *E. coli*) puis à cultiver ledit microorganisme modifié obtenu sur un milieu défini dépourvu de méthionine, S-adenosylméthionine,

homocystéine et cystathionine mais en présence de methylmercaptopan (co-sous-trat exogène), ou de l'un de ses sels, et de sélectionner un microorganisme évolué caractérisé en ce que l'activité méthionine-synthase de la cystathionine γ -synthase se soit fortement améliorée, en présence de methylmercaptopan, au point de remplacer 5 l'activité initialement inactivée. Dans ce mode d'application de l'invention il est important de noter que le milieu utilisé pour sélectionner le microorganisme évolué est identique au milieu sur lequel pousse le microorganisme initial (c'est à dire non modifié) ; seul un co-sous-trat (e.g. methylmercaptopan) est ajouté. Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la souche bactérienne sélectionnée 10 comprenant le microorganisme évolué selon l'invention, est une souche de *E. coli*, plus préférentiellement la souche *E. coli* K183, déposée sous le numéro I-3005, le 2 avril 2003 à la Collection Nationale de Culture et Microorganismes (CNCM) 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex15, France, selon les dispositions du traité de Budapest. Cette souche comprend un gène exprimant une cystathionine- γ -synthase 15 modifiée, l'enzyme comprenant la mutation E325A, et une inactivation du gène *metE*. Dans un mode particulier d'application de cette invention, il est aussi possible d'utiliser des souches ayant en plus les délétions *metC* et/ou *metH* et/ou *metJ*.

Dans un second mode tout aussi préféré d'application de l'invention, ladite modification de la souche initiale, notamment *E. coli*, consiste à inactiver l'activité 20 cystathionine- β -lyase (codée par le gène *metC* chez *E. coli*) puis à cultiver ledit microorganisme modifié obtenu sur un milieu défini dépourvu de méthionine, S-adenosylmethionine, homocystéine et cystathionine puis de sélectionner un microorganisme évolué caractérisé en ce que l'activité homocystéine-synthase de la cystathionine γ -synthase se soit fortement améliorée, en présence d'H2S endogène, 25 au point de remplacer l'activité initialement inactivée. Dans ce mode d'application de l'invention il est important de noter que le milieu utilisé pour sélectionner le microorganisme évolué est identique au milieu sur lequel pousse le microorganisme initial (c'est à dire non modifié). Dans un mode particulier de cette application, il est aussi possible d'ajouter dans le milieu du NaSH. Dans un autre mode particulier de 30 cette application il est possible d'utiliser une souche qui présente en plus au moins une mutation prise parmi *metH* et/ou *metJ*.

Dans un troisième mode tout aussi préféré d'application de l'invention, ladite modification de la souche initiale, notamment *E. coli*, consiste à inactiver les activités succinyl-homosérol (codée par le gène *metB*) et méthionine-synthase native (codée par le gène *metE* chez *E. coli*) puis à introduire l'activité acetyl-5 homoserine sulfhydrylase (codée par le gène *metY* de *C. glutamicum*) et à cultiver ledit microorganisme modifié obtenu sur un milieu défini dépourvu de méthionine, S-adenosylmethionine, homocystéine et cystathionine mais supplémenté en methylmercaptide de sodium afin de sélectionner un microorganisme évolué caractérisé en ce que l'activité méthionine-synthase portée par l'acetyl-homoserine 10 sulfhydrylase (METY) se soit fortement améliorée, en présence de methylmercaptide de sodium, au point de remplacer l'activité méthionine-synthase initialement inactivée. Dans ce mode d'application de l'invention il est important de noter que le milieu utilisé pour sélectionner le microorganisme évolué est identique au milieu sur lequel pousse le microorganisme initial (c'est à dire non modifié) ; seul un co-15 substrat (e.g. methylmercaptan) est ajouté. Dans un mode particulier de cette application il est possible d'utiliser une souche qui présente en plus au moins une mutation prise parmi *metH* et/ou *metJ* et/ou *metC*.

Le procédé de préparation de souches selon l'invention consiste à obtenir, à partir d'une souche bactérienne initiale, une souche bactérienne génétiquement 20 modifiée présentant au moins une modification dans un gène codant pour une enzyme à activité « méthionine synthase » (e.g. *MetE*) ou « homocystéine synthase » (e.g. *MetC*). ledit procédé comprenant une étape consistant à soumettre ladite souche bactérienne initiale à une pression de sélection en présence de la source de soufre définie ci-dessus, afin de diriger une évolution d'au moins un gène (e.g. *metB*) dans 25 ladite souche bactérienne, afin de restaurer une activité « méthionine synthase » ou « homocystéine synthase » dans la souche évoluée ; cette restauration d'activité n'étant pas liée à une réversion de la modification réalisée.

Une activité « méthionine-synthase » ou « homocystéine-synthase » est améliorée dans la souche évoluée (E) de microorganisme par rapport à la souche modifiée (M) lorsque la production de méthionine dans les mêmes conditions de culture (dans un milieu contenant une quantité efficace de méthylmercaptan) est supérieure pour la souche (E) que pour la souche (M). Cette amélioration est

préférentiellement observée par étude de la quantité de méthionine produite. Dans certains cas, on peut observer cette amélioration par l'augmentation du taux de croissance de la bactérie (E) par rapport au taux de croissance de la bactérie (M), dans un milieu minimum ne contenant pas de méthionine.

5 L'homme de métier saura identifier d'autres gènes codant des activités enzymatiques pouvant évoluer en activité « méthionine synthase » ou en « homocystéine synthase » et saura adapter en conséquence les modifications à apporter au microorganisme initial avant de le sélectionner. A titre d'exemple on citera les cystéines synthases A et B codées par les gènes *cysK* et *cysM* chez les
10 bactéries.

Pour les cystathionine- γ -synthases modifiées définies précédemment et ci-dessous, le substrat est avantageusement la O-acétyl-L-homosérine ou la O-succinyl-L-homosérine, de préférence la O-succinyl-L-homosérine.

15 Pour les acylhomosérine sulfhydrylases modifiées définies précédemment et ci-dessous, le substrat est avantageusement la O-succinyl-L-homosérine ou la O-acétyl-L-homosérine, de préférence la O-acétyl-L-homosérine.

Pour ces deux enzymes, la modification consiste en une mutation de manière à ce que le méthylmercaptopan ou le sulfure d'hydrogène soit préféré par rapport à la L-cystéine.

20 Dans une application particulière de l'invention, la séquence codant pour la cystathionine- γ -synthase ou l'acylhomosérine sulfhydrylase est

- soit un gène natif, présent dans le génome de la souche initial (I) où il est exprimé pour permettre la traduction de l'enzyme correspondante,
- soit un gène hétérologue comprenant une séquence codant pour une cystathionine- γ -synthase ou une acylhomosérine sulfhydrylase, sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression et sa traduction dans la souche modifiée (M) où il aura été introduit.

25 De manière avantageuse, les cystathionine- γ -synthases hétérologues sont sélectionnées parmi les cystathionine- γ -synthases correspondant au PFAM référence PF01053 et au COG référence CPG0626.

Dans un mode de réalisation préféré, la souche bactérienne modifiée comprend une inactivation d'au moins un gène endogène choisi parmi *metB*, *metJ*, *metC*, *metE*, *metH*.

Une mutation du gène *metJ* a été proposée dans JP 2000157267-A/3, pour 5 produire une quantité supérieure de méthionine (voir aussi GenBank E35587). Ce gène code pour une protéine de répression des gènes *met B*, *E*, *L*, *J* et *R* (chez *Salmonella typhimurium*). Son inactivation ou sa modification permet de diminuer le rétrocontrôle par la méthionine.

Le gène *metC* (GenBank M12858), code la cystathionine- β -lyase (EC 10 4.4.1.8), les gènes *metE* (GenBank AE000458) et *metH* (GenBank J04975) codent la méthionine synthase (EC 2.1.1.13). La méthionine est un acide aminé essentiel à la vie cellulaire. L'inactivation d'un ou plusieurs de ces gènes revient à supprimer la voie habituelle de biosynthèse de la méthionine.

15 Un autre objet de l'invention est donc un procédé d'évolution et de sélection d'une souche bactérienne modifiée, possédant un gène codant pour une enzyme cystathionine- γ -synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, en vue d'obtenir une souche bactérienne génétiquement modifiée produisant un acide aminé de formule (I), R-S-(CH₂)₂-CHNH₂-COOH (I) en particulier de la L-méthionine, et présentant 20 une modification dans le gène de ladite enzyme, induisant une modification de l'activité « méthionine synthase » en présence d'un composé soufré défini précédemment, présentant l'étape consistant à soumettre ladite souche bactérienne à une pression de sélection en présence du composé soufré, afin de diriger une évolution du gène codant pour ladite enzyme cystathionine- γ -synthase ou 25 acylhomosérine sulfhydrylase, dans ladite souche bactérienne, ladite évolution consistant en au moins une mutation pour leur permettre de réaliser de manière préférentielle la conversion directe du substrat en méthionine ou en homocystéine.

30 Ladite souche bactérienne initiale présente éventuellement une inactivation et/ou une suractivation, notamment par insertion d'un promoteur fort constitutif, d'au moins un gène endogène.

L'invention se rapporte également à une souche bactérienne présentant une modification dans le gène de l'enzyme cystathionine- γ -synthase et/ou dans le gène de

l'enzyme acylhomosérine sulfhydrylase, induisant une augmentation de l'activité « méthionine synthase » de ladite enzyme en présence du composé soufré, en particulier de méthyl-mercaptopan. Une telle souche peut également présenter au moins une autre modification génétique, (inactivation, mutation ou surexpression d'un gène 5 endogène), telle que mentionnée ci-dessus.

La souche selon l'invention est de préférence susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'invention, et en particulier est obtenue par le procédé selon l'invention.

10 L'invention se rapporte également à un procédé de préparation de méthionine, dans lequel on cultive un microorganisme à activité « méthionine synthase » modifiée telle que défini précédemment, en présence d'un composé soufré dans un milieu approprié, ledit milieu approprié comprenant une source de carbone simple telle que définie précédemment. De préférence, la méthionine est la L-méthionine, et ledit composé soufré est le méthyl-mercaptopan ou l'H₂S.

15 Les milieux peuvent être supplémentés pour compenser les auxotrophies autres que celle provoquée par la délétion des gènes *metE* et/ou *metC* et/ou *metB*; ils contiennent une concentration en carbone simple adaptée en fonction du mode de culture et de production, ainsi que du composé soufré en concentration adaptée en fonction de l'évolution de la souche et du mode de production retenu.

20 Après fermentation la méthionine est récupérée selon les méthodes usuelles, et le cas échéant, purifiée.

Les techniques de récupération puis de purification de la méthionine dans les milieux de culture sont bien connues de l'homme du métier.

La présente invention concerne également un procédé de préparation de 25 méthionine dans lequel on fait réagir substrat dérivé de formule générale (III)



dans laquelle R'' représente un radical acyle, de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,

30 avec une enzyme à activité « méthionine synthase » évoluée telle que définie précédemment, dans un milieu réactionnel approprié comprenant un composé soufré défini précédemment.

Le milieu réactionnel approprié est un milieu usuel de réaction enzymatique, bien connu de l'homme du métier, en particulier un milieu aqueux dans lequel les substrats et l'enzyme sont en solution ou en suspension. Les conditions de mise en œuvre de la réaction sont bien connues de l'homme du métier, afin notamment 5 d'éviter une dénaturation substantielle de l'enzyme.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'enzyme à activité « méthionine synthase » évoluée est présente dans une bactérie inactivée ou dans un extrait cellulaire.

Selon un autre mode particulier de réalisation de l'invention, l'enzyme à 10 activité « méthionine synthase » évoluée est une enzyme purifiée.

D.II. Voie de biosynthèse de la cystéine

L'application de l'invention peut aussi se faire par exemple sur la voie de biosynthèse de la cystéine (figure 3) et permet d'obtenir des souches de microorganismes évolués, en particulier des bactéries, notamment *E. coli* et les 15 corynébactéries, produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)propionique de formule générale (I)



dans laquelle R représente un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 18 atomes de carbones, éventuellement substitué par un ou des groupes hydroxy, 20 ou un radical aryle ou hétéroaryle comprenant un ou plusieurs atomes d'azote ou de soufre dans le cycle hétéroaromatique, sélectionné parmi les groupes phényle, pyridyle, pyrolyle, pyrazolyle, triazolyle, tetrazolyle, thiazolyle, ou thienyle,

par métabolisme d'une source de carbone simple et d'une source de soufre comprenant un composé de formule générale (II) :



dans laquelle R' représente un atome d'hydrogène ou R, R étant défini précédemment, et ses sels physiologiquement acceptables.

lesdites souches présentant au moins un gène codant pour une enzyme mutée à activité « cystéine synthase évoluée ».

30 Par sel physiologiquement acceptable, on entend selon l'invention les sels du composé de formule générale (I) qui n'affectent pas le métabolisme et la capacité de

croissance de la souche de microorganisme selon l'invention, notamment les sels de métaux alcalins comme le sodium.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, R représente un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 4 atomes de carbone, en 5 particulier choisi parmi les radicaux méthyle, éthyle, n-propyle, i-propyle, n-butyle, i-butyle ou t-butyle. De manière plus préférentielle, R représente le radical méthyle.

L'acide 2-amino-4-(alkylmercaptopropionique de formule générale (I) obtenu est de préférence la L-cystéine.

Par enzyme à activité « cystéine synthase évoluée », on entend selon 10 l'invention toute enzyme mutée impliquée dans la biosynthèse de l'acide aminé de formule générale (I), en particulier de la L-cystéine dont l'activité essentielle consiste à effectuer la conversion directe d'une acétylsérine, de préférence de la O-acétyl-L-sérine en acide aminé de formule générale (I) en présence de composé soufré de 15 formule générale (II), l'activité essentielle de l'enzyme initiale non mutée n'étant pas une activité « cystéine synthase ». Les enzymes naturellement impliquées dans la biosynthèse de la cystéine par conversion directe de la O-acétyl-L-sérine (acétylsérine) en L-cystéine en présence de sulfure d'hydrogène (H₂S), comme les cystéine synthases A ou B, codées par les gènes *cysK* ou *cysM*, respectivement, sont donc exclues de cette définition.

20 De manière préférentielle, l'enzyme « initiale » non mutée est une enzyme catalysant une réaction de sulphydrylation en présence d'H₂S, de préférence une enzyme à activité O-acyl-L-homosérine sulphydrylase.

De manière avantageuse, les enzymes « initiales » à activité O-acyl-L-homosérine sulphydrylases sont choisies parmi les O-acyl-L-homosérine 25 sulphydrylases correspondant au PFAM référence PF01053 et au COG référence COG2873.

30 L'O-acyl-L-homosérine sulphydrylase est plus préférentiellement choisie parmi les O-acyl-L-homosérine sulphydrylase codées par le gène *metY* de *Corynebacterium*, en particulier le gène *metY* de *C. glutamicum* (Genbank AF220150), et les enzymes homologues présentant la même activité O-acyl-L-homosérine sulphydrylase, et au moins 80% d'homologie de séquence avec l'O-acyl-L-homosérine sulphydrylase codée par le gène *metY* de *C. glutamicum* (Genbank

AF220150), préférentiellement au moins 85 % d'homologie, plus préférentiellement au moins 90 % d'homologie.

L'invention est basée notamment sur le fait que l'on peut obtenir, de façon dirigée, une modification de la spécificité de substrat de l'enzyme acyl-homosérine 5 sulfhydrylase afin qu'elle utilise préférentiellement l'acetylsérine. En conséquence l'invention est basée sur le fait que l'on peut modifier de façon dirigée la spécificité de substrat de l'enzyme non modifiée afin d'évoluer d'une activité acylhomoserine sulfhydrolase à une activité cystéine synthase.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, les souches de 10 microorganismes non modifiés ne possèdent pas naturellement d'activité O-acyl-L-homosérine sulfhydrolase ou ne possèdent pas de gène homologue au gène *metY* codant pour cette enzyme.

Les souches modifiées selon l'invention sont génétiquement modifiées par inactivation, mutation et/ou suractivation d'au moins un gène endogène dans le but 15 de permettre l'évolution d'une nouvelle voie métabolique. En particulier, les souches de microorganismes selon l'invention sont génétiquement modifiées afin de supprimer les gènes *cysK* et/ou *cysM* codant les protéines portant respectivement les activités enzymatiques cystéine synthase A, cystéine synthase B. De manière préférentielle, les gènes *cysK* et *cysM* sont supprimés.

20 Le gène *cysK* (figure 4) code la cystéine synthaseA (GenBank NP_416909) et le gènes *cysM* code la cystéine synthase B (GenBank NP_416916). L'inactivation de ces gènes revient à supprimer les voies de biosynthèse de la cystéine et donc à rendre la souche auxotrophe pour la cystéine.

On introduit alors dans les bactéries modifiées un gène codant pour une 25 enzyme catalysant une réaction de sulfhydrylation en présence d'H₂S, telle que définie précédemment, à l'exclusion des enzymes dont l'activité principale est une activité cystéine synthase (aussi dénommée O-acetylsérine sulfhydrolase), en particulier un gène codant pour une O-acyl-L-homosérine sulfhydrolase, comme le gène *metY* de *Corynebacterium*, en particulier le gène *metY* de *C. glutamicum* 30 (Genbank AF220150).

Le gène codant pour une enzyme catalysant une réaction de sulfhydrylation en présence d'H₂S peut-être introduit dans la bactérie à modifier selon les techniques

usuelles à la disposition de l'homme du métier, soit par intégration directe dans le génome, soit porté par un plasmide réplicatif.

La souche ainsi modifiée est de préférence sélectionnée et améliorée par un procédé de criblage et d'évolution, qui est aussi un objet de l'invention et qui permet 5 de faire évoluer l'activité acyl-homosérine sulfhydrylase en une activité cystéine synthase afin de restaurer la production de cystéine.

La transformation de l'activité acyl-homosérine sulfhydrylase en activité « cystéine synthase évoluée » sera réputée acquise lorsque la souche bactérienne génétiquement modifiée puis évoluée (E) aura une vitesse de croissance au moins 10 similaire à celle de la souche modifiée (M) initiale lorsque cultivée dans un milieu minimum en présence de glucose pour seule source de carbone. Dans un mode particulier on considérera la transformation de l'activité acyl-homosérine sulfhydrylase en activité « cystéine synthase évoluée » sera réputée acquise lorsque l'activité cystéine synthase portée par la protéine O-acyl-L-homosérine sulfhydrolase 15 modifiée sera améliorée de 10% par rapport à son activité initiale. Dans certains cas, on peut observer cette amélioration par l'augmentation du taux de croissance de la bactérie (E) par rapport à celui de la bactérie (M). Enfin cette transformation de l'activité acyl-homosérine sulfhydrylase en activité « cystéine synthase évoluée » sera réputée acquise lorsque la souche (E) produira au moins autant de cystéine que 20 la souche (M) dans des conditions de culture équivalentes, ne contenant pas de cystéine initialement.

Les souches selon l'invention peuvent également être génétiquement modifiées par inactivation, mutation et/ou suractivation d'au moins un gène endogène, la modification étant effectuée préalablement ou non à la mise en œuvre 25 de l'évolution de la souche modifiée. On peut le cas échéant altérer le gène metB codant l'activité cystathionine γ -synthase.

On peut le cas échéant supprimer le gène codant l'activité cystathionine gamma-lyase.

Dans un mode de réalisation, ladite souche bactérienne peut comprendre 30 également une modification de l'activité sérine O-acyltransférase porté par le gène cysE (figure 4) afin de lui conférer une insensibilité à la rétro-inhibition par la cystéine.

Dans un autre mode de réalisation, ladite souche bactérienne peut comprendre également une surexpression du gène *cysB* afin de déréguler la voie d'assimilation du soufre en H₂S.

Il peut-être également avantageux pour la production d'acides aminés de 5 formule (I), de préférence de la L-cystéine, de surexprimer le gène codant l'acetyl-CoA synthétase, comme le gène *acs* (EC 6.2.1.1), ayant le numéro d'accession AE000480, en même temps que le gène codant pour une enzyme à activité « cystéine synthase améliorée » défini précédemment (figure 4).

Il peut également être avantageux d'atténuer, voire de supprimer les gènes 10 codant pour une acétate kinase et/ou pour une phosphotransacetylase, notamment les gènes *ack* et *pta* ayant respectivement les numéros d'accession AE000318 et AE000319, et codant respectivement une acétate kinase (EC 2.7.2.1) et une phosphotransacetylase (EC 2.3.1.8). Cette atténuation/suppression est de préférence combinée à une surexpression du gène codant l'acetyl-CoA synthétase.

15 Toutes ces modifications mentionnées ci-dessus peuvent être effectuées sur la souche modifiée préalablement au processus d'évolution du gène *metY* ou sur la souche évoluée, c'est à dire postérieurement à l'évolution du gène *metY*, à l'exception des délétions *cysK* et/ou *cysM* qui doivent être obligatoirement réalisées avant le processus de culture et d'évolution de la souche modifiée.

20 L'invention concerne donc également un procédé de préparation d'une souche bactérienne à activité « cystéine synthase évoluée » telle que définie précédemment, ledit procédé comprenant une étape consistant à cultiver dans un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple et une souche bactérienne comprenant une enzyme catalysant une réaction de sulphydrylation en 25 présence d'H₂S dont l'activité essentielle n'est pas une activité « cystéine synthase » telle que définie précédemment, afin de diriger une évolution du gène codant pour ladite enzyme dans ladite souche bactérienne, vers un gène codant pour une activité « cystéine synthase évoluée ».

30 L'invention se rapporte également à un procédé de préparation de cystéine, dans lequel on cultive un microorganisme à activité « cystéine synthase évoluée » tel que défini précédemment dans un milieu de culture approprié, ledit milieu approprié comprenant une source de carbone simple telle que définie précédemment.

La définition des conditions de fermentation est du ressort de l'homme du métier. La fermentation est conduite en fermenteurs avec un milieu minéral de culture de composition connu défini et adapté en fonction des bactéries utilisées, contenant au moins une source de carbone simple.

5 Les milieux peuvent être supplémentés pour compenser les auxotrophies autres que celle provoquée par la délétion des gènes *cysK* et/ou *cysM* ; ils contiennent une concentration en carbone simple adaptée en fonction du mode de culture et de production, ainsi que du composé soufré de formule (II) en concentration adaptée en fonction de l'évolution de la souche et du mode de production retenu.

10 Après fermentation, la cystéine est récupérée selon les méthodes usuelles, et le cas échéant, purifiée.

Les techniques de récupération puis de purification de la cystéine dans les milieux de culture sont bien connues de l'homme du métier.

La présente invention concerne aussi un procédé de préparation d'un acide 15 aminé de formule générale (I) tel que défini précédemment, caractérisé en ce que l'on fait réagir de l'acétylsérine avec une enzyme à activité « cystéine synthase évoluée » telle que définie précédemment, dans un milieu réactionnel approprié comprenant un composé soufré de formule générale (II) défini précédemment.

Le milieu réactionnel approprié est un milieu usuel de réaction enzymatique, 20 bien connu de l'homme du métier, en particulier un milieu aqueux dans lequel les substrats et l'enzyme sont en solution ou en suspension. Les conditions de mise en œuvre de la réaction sont bien connues de l'homme du métier, afin notamment d'éviter une dénaturation substantielle de l'enzyme.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'enzyme à activité 25 « cystéine synthase évoluée » est présente dans une bactérie inactivée ou dans un extrait cellulaire.

D.III. Evolution des voies NADPH dépendantes.

Selon un autre mode préférentiel de réalisation de l'invention, on peut choisir de faire évoluer une voie métabolique utilisant le NADPH. Pour cela, la souche 30 bactérienne initiale doit être modifiée de telle sorte que la vitesse de production du NADPH soit supérieure à sa vitesse d'oxydation en NADP+ (aussi écrit NADP) ce

qui empêchera la croissance de la bactérie sur le milieux défini choisi pour mettre en œuvre le procédé.

La présente invention concerne des souches de microorganismes modifiées pour permettre l'évolution de voies métaboliques consommatriques de NADPH. Les 5 souches selon l'invention sont utilisables dans des procédés de biotransformation consommatriques de NADPH.

La présente invention concerne également un procédé de préparation de molécules par biotransformation comprenant la culture dans un milieu approprié d'une souche selon l'invention, ladite souche comprenant également les éléments 10 génétiques nécessaires à la préparation de ladite molécule.

Les procédés de biotransformation ont été développés pour permettre la production de molécules en grande quantité à des coûts faibles, tout en permettant également la valorisation de différents sous-produits industriels ou de l'agriculture.

Pour produire des molécules d'intérêt par biotransformation *in vivo* on 15 distinguera deux grandes approches :

- d'une part la fermentation qui permet la production de molécules par un microorganisme à partir d'une source de carbone simple (e.g. WO0102547 qui décrit la production de lysine par fermentation de *C. glutamicum* en présence de glucose),
- 20 - d'autre part la bioconversion par un microorganisme d'un substrat donné différent de la source de carbone simple, qui est utilisée seulement pour produire la biomasse nécessaire, pour la production d'une molécule d'intérêt (e.g. WO0012745 qui décrit la production de dérivés R-pipéridine, WO0068397 qui décrit la production de Tagatose).

25 L'amélioration d'un procédé de biotransformation peut porter sur différents facteurs comme la température, l'oxygénation, la composition du milieu, le procédé de récupération, etc. On peut aussi envisager de modifier le microorganisme de telle sorte que la production de la molécule d'intérêt et/ou son excrétion soit augmentée.

Dans le cadre d'une fermentation on s'attachera par exemple à optimiser la 30 voie de biosynthèse, par exemple en modifiant la régulation des gènes ou en modifiant le gène afin de modifier les caractéristiques enzymatiques ou encore en optimisant la régénération des co-substrats.

Dans le cadre de la bioconversion on s'attachera à améliorer les caractéristiques cinétiques des enzymes, à réduire la formation de co-produits et à optimiser la régénération de co-substrats impliqués dans la ou les étapes de bioconversion.

5 Parmi les co-substrats impliqués dans les biotransformations, le NADPH prend une part importante notamment pour la production des acides aminés (e.g. arginine, proline, isoleucine, méthionine, lysine), de vitamine (e.g. panthoténate, phylloquinone, tocophérol), de molécules aromatiques (e.g. WO9401564), ou d'autres molécules à haute valeur ajoutée.

10 La présente invention concerne des souches de microorganismes modifiés pour permettre l'évolution des enzymes ou de voies métaboliques consommatoires de NADPH.

15 Pour la création de tels microorganismes, les inventeurs ont opté pour des modifications qui augmentent la vitesse de production du NADPH et diminue sa vitesse d'oxydation en NADP+, lesdits microorganismes modifiés étant ensuite employés pour faire évoluer des enzymes ou des voies métaboliques consommatoires de NADPH. Ces bactéries pouvant aussi être judicieusement utilisées dans des procédés de production par biotransformation, de molécules issues de voies de synthèse NADPH dépendantes.

20 L'optimisation du NADPH est décrite ci-après pour *E. coli*. Le même principe peut être appliqué de manière similaire à tous les microorganismes cultivés en conditions aérobies.

25 Les souches modifiées selon l'invention comprennent une délétion du gène *udhA* et/ou du gène *qor*. Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, les gènes *udhA* et *qor* sont tous deux délétés.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la souche modifiée selon l'invention comprend également une délétion d'un gène choisi parmi *pgi* ou *pfkA* et/ou *pfkB*.

30 Les gènes ci-dessus sont bien connus de l'homme du métier et décrits dans la littérature scientifique, notamment pour *E. coli*:

Gènes et références dans *E. coli* :

udhA : X66026 soluble pyridine transhydrogenase;

qor : L02312 quinone oxidoreductase;

pgi : X15196 phosphoglucose isomerase (EC 5.3.1.9);

pfkA : X02519 phosphofructokinase-1;

pfkB : K02500 phosphofructokinase-2.

5 La présente invention a également pour objet un microorganisme évolué, modifié pour la production de NADPH telle que définie ci-dessus et ci-après, lequel comprend également, un ou plusieurs gènes codant des enzymes NADPH dépendantes, impliquées dans la biotransformation d'une molécule d'intérêt, que l'on souhaite faire évoluer, ainsi qu'un ou plusieurs gènes marqueurs de sélection.

10 Ces gènes peuvent être natifs de la souche modifiée selon l'invention ou encore introduits dans la souche optimisée selon l'invention par transformation avec un vecteur approprié, soit par intégration dans le génome du microorganisme ou encore par un vecteur réplicatif, ledit vecteur approprié portant un ou plusieurs gènes codant pour lesdites enzymes impliquées dans la bioconversion de ladite molécule 15 d'intérêt ou lesdits marqueurs de sélection.

Ces gènes comprennent une séquence d'acide nucléique codant pour une enzyme impliquée dans la biotransformation de la molécule d'intérêt et/ou pour un marqueur de sélection, la séquence codante étant fusionnées à des séquences promotrices efficaces dans la cellule procaryote et/ou eucaryote choisie pour la 20 biotransformation. Le vecteur (ou plasmide) peut-être un vecteur navette entre *E. coli* et un autre microorganisme.

La présente invention concerne également un procédé de préparation des souches modifiées selon l'invention telle que définies ci-dessus et ci-après, dans lequel on délète les gènes *udhA* et/ou *qor*, et le cas échéant les gènes *pgi* ou *pfkA* 25 et/ou *pfkB*.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le procédé de préparation de souches selon l'invention comprend également la transformation des souches modifiées avec au moins un vecteur approprié comprenant un ou plusieurs gènes codant une ou plusieurs enzymes consommatrices de NADPH et impliquées 30 dans la biotransformation d'une molécule d'intérêt, ainsi qu'un ou plusieurs gènes marqueurs de sélection. Le vecteur permet soit la réplication des gènes soit leur intégration dans le chromosome de la bactérie modifiée. La transformation de la

souche par le vecteur défini ci-dessus peut être réalisée sur la souche modifiée ou préalablement à la modification de la souche selon l'invention.

La souche modifiée pour la production de NADPH est obtenue par biologie moléculaire.

5 Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation de ces souches modifiées selon l'invention pour faire évoluer des enzymes NADPH dépendantes permettant ainsi d'améliorer leurs caractéristiques cinétiques, d'élargir ou de réduire leur spécificité de substrat, et permettant *in fine* de créer une nouvelle voie métabolique et/ou d'améliorer les rendements de biotransformation. Un autre aspect de
10 l'invention concerne l'utilisation de la souche modifiée ou de la souche évoluée pour réaliser des biotransformations consommatrices de NADPH avec des rendements de biotransformations supérieurs à ceux obtenus dans une souche non modifiée et/ou non-évoluée.

15 L'invention concerne aussi un procédé de production d'une molécule d'intérêt ayant une biosynthèse consommatrice de NADPH caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

20 a) mise en culture des microorganismes évolués selon l'invention dans un milieu de culture approprié favorisant leur croissance et comprenant les substances nécessaires pour la réalisation de la biotransformation par fermentation ou bioconversion, à l'exception du NADPH, et
25 b) extraction de la molécule d'intérêt du milieu et le cas échéant purification.

De manière préférentielle, la molécule d'intérêt est choisie parmi la cystéine, la méthionine, le 3-hydroxypropionate, l'hydrocortisone, le xylitol et le glycérol.

Pour une réaction de bioconversion le procédé comprend aussi l'ajout du
25 substrat à convertir dans le milieu de culture approprié.

Le milieu de culture cité à l'étape b) du procédé selon l'invention défini ci-dessus comprend au moins un hydrate de carbone assimilable choisi parmi différents sucres assimilables, tels le glucose, le galactose, le saccharose, le lactose, ou les mélasses, ou les sous-produits de ces sucres. Une source de carbone simple tout
30 particulièrement préférée est le glucose. Une autre source de carbone simple préférée est le saccharose. Le milieu de culture peut en outre contenir une ou plusieurs

substances (e.g. acides aminés, vitamines, sels minéraux, ...) favorisant la production de la molécule d'intérêt.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, sans toutefois chercher à en limiter la portée.

5 **E. Description des figures**

Figure 1 : synthèse de la méthionine à partir de l'homoséride, chez les bactéries.

10 Figure 2 : Schéma de synthèse de la méthionine selon l'invention appliquée dans *E. coli* ; une stratégie équivalente est transposable chez de nombreux microorganismes dont *C. glutamicum*. Les stratégies *metB** ou *metY*** nécessitent l'utilisation d'une souche initialement au moins $\Delta(\text{metE})$ tandis que les stratégies *metB*** ou *metY** nécessitent l'utilisation d'une souche initialement au moins $\Delta(\text{metC})$.

Légende :

15 MetA : homoséride succinyltransferase ; pourra être remplacé par une isoforme insensible à la rétro-inhibition par la méthionine ou par une isoforme homoserine acetyltransferase éventuellement insensible à la rétro-inhibition par la méthionine.

MetB : cystathionine γ -synthase

20 MetB* : cystathionine γ -synthase évoluée en « méthionine synthase »

MetB** : cystathionine γ -synthase évoluée en homocysteine synthase

MetY* : O-acetyl-homoséride (de *C. glutamicum*) évoluée en homocysteine synthase

25 MetY** : O-acetyl-homoséride (de *C. glutamicum*) évoluée en « méthionine synthase »

La voie centrale représente la voie naturelle de synthèse de la méthionine chez *E. coli*. Les autres voies indiquées correspondent aux procédés selon l'invention.

Figure 3 : synthèse de la cystéine à partir de la séride, chez les bactéries.

Figure 4 : stratégie pour obtenir une synthèse de cystéine à partir d'O-acetyl-L-sérine. La flèche rouge correspond à l'activité cystéine synthase portée par l'enzyme codée par le gène *metY* évolué selon l'invention (*metY**).

Figure 5 : Comparaison de spectres de ^{13}C -RMN, correspondant au carbone 5 de la méthionine, obtenus par HSQC sur un hydrolysat de la souche sauvage (haut) ou de la souche K1a-F optimisée (bas). On observe que le carbone 5 de la souche K1a-F n'est pas marqué au carbone 13 ce qui confirme qu'il provient du méthylmercaptide de sodium

Figure N°6: Evolution du taux de croissance de la souche initiale *E. coli* $\Delta(\text{metE})$ lors du processus de sélection dirigée en batch. Abscisse : repiquage N°; Flèche : Population K144 ; μ déduit : valeurs obtenues à partir de 2-3 valeurs de DO ; μ calculé : valeurs obtenues avec plus de 4 valeurs de DO.

Figure 7 : Cinétique de croissance de la population *E. coli* $\Delta(\text{metC})$ lors de son ensemencement initial (culture N°1) et lors de son dixième repiquage (Repiquage 10).

Figure N°8: Réalisation de la PCR sur la souche modifiée *E. coli* $\Delta\text{metJ} :: \text{Cm}$ en utilisant les amorce DmetJBF et MetJR. L'extrémité 5' de l'amorce DmetJBF est aussi capable de s'hybrider une séquence située dans la partie 3' du gène *metL*.

Figure N°9: Souches obtenues à l'issue de la recombinaison homologue avec le fragment amplifié par PCR (voir Figure 8) ; il est possible d'avoir deux événements différents de recombinaison homologue, chacun ayant la même probabilité de se produire. Dans le premier cas, on recrée une souche *E. coli* $\Delta\text{metJ} :: \text{Cm}$ alors que dans le second cas, on crée la souche *E. coli* $[\Delta\text{metJ}, \Delta\text{metJ} :: \text{Cm}]$ en replaçant le promoteur de l'opéron *metBLF* devant *metL*.

Figure N°10: Evolution du taux de croissance de la souche *E. coli* $[\Delta(\text{metBJ}, \text{metC}) \text{ pTrc-metY}]$ sur un milieu défini (MML8), contenant du glucose pour seule source de carbone.

F. Exemples

F.I. Voie de Biosynthèse de la méthionine.

30 Une première application (Exemple F.I.1.) de l'invention au génie métabolique de la voie de biosynthèse de la méthionine comprend les étapes suivantes :

5 a) Délétion du gène *metE* dans la souche initiale d'*E.coli* ; la souche modifiée obtenue est donc auxotrophe à la méthionine. La souche initiale est capable de croître sur un milieu minimum (MM) dépourvu de méthionine, S-adenosylméthionine, homocystéine, cystathionine alors que la souche modifiée a perdu cette capacité.

10 b) Culture de la souche ci-avant modifiée sur le même milieu minimum (MM) auquel on ajoute le methylmercaptide de sodium (co-substrat) afin de faire évoluer une activité enzymatique endogène en activité méthionine-synthase afin de compenser l'activité enzymatique initialement déleté (MetE).

15 c) Sélection d'une souche évoluée ayant une nouvelle activité méthionine-synthase en présence de methylmercaptide de sodium. La souche étant alors caractérisée.

d) Isolement du gène évolué codant la protéine ayant une activité enzymatique évoluée, en l'occurrence la cystathionine-γ-synthase ayant une activité méthionine-synthase améliorée.

Une deuxième application (Exemple F.I.2.) de l'invention, au génie métabolique de la voie de biosynthèse de la méthionine, comprend les étapes suivantes :

20 a) Délétion du gène *metC* dans la souche initiale d'*E.coli* ; la souche modifiée obtenue est donc auxotrophe à la méthionine. La souche initiale est capable de croître sur un milieu minimum (MM) dépourvu de méthionine, S-adenosylméthionine, homocystéine, cystathionine alors que la souche modifiée a perdu cette capacité.

25 b) Culture de la souche ci-avant modifiée sur le même milieu minimum (MM) en absence de tout co-substrat afin de faire évoluer une activité enzymatique endogène en activité homocystéine-synthase afin de compenser l'activité enzymatique initialement déleté (MetC)

30 Une troisième application (Exemple F.I.3.) de l'invention à l'évolution de la voie de biosynthèse de la méthionine comprend les étapes suivantes :

a) Délétion des gènes *metC*, *metB*, *metJ* dans la souche initiale d'*E.coli* ; la souche modifiée obtenue est donc auxotrophe à la méthionine. La souche

initiale est capable de croître sur un milieu minimum (MM) dépourvu de méthionine, S-adénosylméthionine, homocystéine, cystathionine alors que la souche modifiée a perdu cette capacité.

5 a) Introduction du gène *metY*, un gène hétérologue issu de *C. glutamicum*. Ce gène étant destiné à évoluer d'une activité acetylhomosérine sulfhydrylase en une activité méthionine-synthase.

10 b) Culture de la souche modifiée *E. coli* [*metY* Δ(*metB*, *metC*, *metJ*)] sur le même milieu minimum (MM) auquel on ajoute le methylmercaptide de sodium (co-substrat) afin de faire évoluer une activité enzymatique endogène en activité méthionine-synthase afin de compenser les activités enzymatiques initialement déletées (*MetB*, *MetC*).

c) Sélection d'une souche évoluée ayant une nouvelle activité méthionine-synthase en présence de methylmercaptide de sodium.

15 **Exemple F.I.1 Obtention d'une souche évoluée ayant une activité méthionine-synthase en présence de methylmercaptide de sodium.**

a) **Construction de la souche modifiée *E. coli* Δ(*metE*)**

L'inactivation du gène *metE* est réalisée en insérant une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en déletant la majeure partie du gène concerné: La technique utilisée est décrite par Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step 20 inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645.

Deux oligonucléotides sont utilisés pour réaliser la stratégie:

- DmetER de 100 bases (SEQ ID NO 1):

25 taccggccgacgcaaggttctgcgcgcctgcaccatgttcgcgcagggtttctggccagccgcgc
gttttcagCATATGAATATCCTCCTTAG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (4012903 à 4012824) du gène *metE* (séquence 4010643 à 4012904, séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

30 une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L.

(2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645)

- DmetEF de 100 bases (SEQ ID NO 2):

tgacaatattgaatcacaccctcggttccctcgcggtggctgcgtcgagctgaaaaaagcgcaagaaagt

5 tattggTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (4010644 à 4010723) du gène *metE*

10 une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol portée par le plasmide pKD3

Les oligonucléotides DmetER et DmetEF sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinase exprimée permet la recombinaison 15 homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides metER et metEF.

MetER (SEQ ID NO 3) : ggtttaaggcagtatgggtggaaagaagtcgc (homologue à la séquence de 4012978 à 4012949)

20 MetEF (SEQ ID NO 4) : cccggggatgaataaacttgccgcctccc (homologue à la séquence de 4010567 à 4010596)

La cassette de résistance au chloramphénicol peut ensuite être éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches 25 recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment.

b) Culture et évolution de la souche modifiée $\Delta(me\acute{e}E)$ en présence de méthylmercaptide de sodium pour co-sous-trait

30 Pour optimiser *E. coli* pour la production de méthionine à partir du méthyl-mercaptan, on effectue une sélection dirigée en flacons.

La souche *E. coli* rendue auxotrophe pour la méthionine en inactivant le gène *metE* (voir ci-avant) ne peut donc croître qu'en fabriquant sa propre méthionine, par l'utilisation du méthyl-mercaptan.

La mise en œuvre de cette technique permet la sélection d'une souche de 5 *Escherichia coli* dont la cystathionine-γ-synthase (EC 4.2.99.9) a développé une activité « méthionine-synthase » modifiée en présence de méthyl-mercaptan.

La sélection dirigée est conduite en flacon en verre hermétiquement fermé contenant 50 mL de milieu minéral (Schaefer et al., 1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96) en présence de 33 mM glucose, et du chloramphénicol à une concentration finale 10 de 25 mg/l.

Les milieux de culture sont ensemencés avec la souche *E. coli* K12 Δ *metE* à DO_{600nm} définie. On ensemence avec une population de bactéries suffisamment 15 importante pour que certaines bactéries possèdent potentiellement des mutations spontanées intéressantes dans le gène *metB*, permettant d'assimiler le méthyl-mercaptan. Cette population a été obtenue par culture de la souche auxotrophe en méthionine sur milieu minimum supplémenté en méthionine.

Trois flacons reçoivent alors 100 μ L d'une solution à 400 mg/L de sodium mercaptide, tandis qu'un quatrième flacon ne reçoit pas de sodium mercaptide. Les cultures sont réalisées sous agitation, à 37°C, pendant 6 jours, puis la DO_{600nm} est 20 mesurée. Les résultats sont résumés dans le Tableau N°1 ci-dessous.

| | Flacon 1 | Flacon 2 | Flacon 3 | Flacon Témoin |
|---------------------------------|----------|----------|----------|---------------|
| DO _{600nm} à T=0 | 0.34 | 0.34 | 0.34 | 0.34 |
| DO _{600nm} à T=6 jours | 0.23 | 1.14 | 0.79 | 0.32 |

Tableau 1. Mesure de la densité optique de milieux de cultures pour *E. coli* en présence (flacons 1-3) ou absence (flacon témoin) de sodium mercaptide.

Ces résultats montrent que les flacons 2 et 3 ont permis de multiplier une 25 souche capable d'utiliser le méthyl-mercaptan pour produire la méthionine nécessaire à sa croissance (augmentation de la densité optique).

c) Sélection de la souche évoluée en présence de méthylmercaptide de sodium.

La population d'*E. coli* $\Delta(meI$ E) issue du flacon 2 subi des repiquages successifs en flacons, permettant d'obtenir la population K1a-F.

La nouvelle population obtenue K1a-F est mise en culture dans un milieu minimum (Schaefer *et al.*, 1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96) contenant 2,5 g.l⁻¹ de glucose entièrement marqué au carbone 13 et du méthylmercaptide de sodium (200 ppm) non enrichi en carbone 13. Cette population est auxotrophe pour la méthionine en l'absence de méthylmercaptide de sodium.

Après la culture, les cellules sont récupérées, lavées puis hydrolysées par HCl 6N pendant 24 heures à 107°C. Une analyse par RMN bidimensionnelle est alors réalisée (HSQC). Cette analyse permet d'étudier le carbone 5 de la méthionine, qui provient, soit de la L-cystéine, produite à partir du glucose présent dans la solution (voie classique), soit du méthylmercaptide de sodium lorsque la nouvelle voie métabolique selon l'invention est utilisée.

L'expérience est conduite de manière similaire avec la souche sauvage *E. coli* K12 (produisant la méthionine à partir du glucose), en absence de méthylmercaptide de sodium.

La figure 5 montre deux spectres 1D, issus de deux acquisitions distinctes, superposés pour une meilleure lecture. Ces spectres 1D sont extraits de spectres RMN à deux dimension type HSQC (corrélation entre protons et carbone 13). Les spectres RMN à deux dimensions ont été obtenus sur un hydrolysat acide des bactéries.

L'échantillon analysé est un hydrolysat total ; cependant du fait de la sensibilité de la RMN et des temps d'acquisition utilisés, on détecte essentiellement les acides aminés, les sucres, les bases et le glycérol. Chaque carbone (couplé à un proton) de chaque acide aminé donne une résonance magnétique nucléaire.

Le carbone 5 de la méthionine (c'est à dire le groupe méthyl terminal) présente un déplacement chimique d'environ 14.7 ppm. La figure 5 présente la zone de déplacement chimique centrée autour de 14.7 ppm pour les deux souches.

On remarque que dans le cas du spectre supérieur, le signal du carbone 5 est fort, indiquant que le carbone 5 est marqué au carbone 13. En conséquence, ce carbone 5 provient du glucose marqué introduit comme substrat dans le milieu de culture.

On remarque par contre que le même signal est très faible dans le spectre inférieur (souche K1a-F). Cela signifie que le carbone 5 n'est pratiquement pas marqué. Pourtant les autres carbones de la molécule sont fortement marqués (résultats non présentés). Le carbone 5 non marqué ne provient donc pas du glucose 5 mais du méthyl-mercaptan.

On peut donc conclure que la souche K1a-F produit de la méthionine à partir de succinyl-L-homosérine et de méthylmercaptide de sodium.

La population K1a-F subit 14 nouveaux cycles de repiquage successifs en flacon. On obtient ainsi la population K144 (figure 6) que l'on étale alors sur milieu 10 minimum gélosé contenant du glucose pour seule source de carbone. Les boites inoculées sont placées en condition aerobie dans une jarre anaérobie dans laquelle est introduit un tube contenant du méthylmercaptide de sodium dissout dans de l'eau, la jarre est alors placée dans un incubateur à 37°C. La température d'ébullition du méthylmercaptide de sodium étant de 5°C, l'atmosphère de la jarre anaérobie 15 s'enrichie en méthylmercaptan. Après 4 jours, les clones apparaissent sur les boites ; ils correspondent aux bactéries capables de produire de la méthionine en présence de méthylmercaptan. Dix clones sont isolés, dont le clone K176. Le clone K176 est multiplié en culture liquide et des stocks glycérols sont réalisés portant le numéro K183.

20 Le clone est envoyé au séquençage en même temps que. Pour le clone K183 et la souche *E. coli* K12 $\Delta(metE)$ initiale, la séquence des gènes *metJ* et *metB* (SEQ ID N°5) a été déterminée. La séquence obtenue pour *metB* évoluée, appelée *metB** (SEQ ID N°7) permet d'observer la présence d'une alanine en position 325 (SEQ ID N°8) en remplacement d'un glutamate (SEQ ID N°6). Le gène *metJ* ne présente 25 aucune mutation. Cette souche a été déposée à la CNCM le 2 avril 2003, sous le numéro I-3005.

• Caractérisation du clone K183

Le clone K183 est cultivé en flacon, en milieu minimum avec glucose et méthylmercaptide de sodium pour seule source de carbone. En parallèle, une culture 30 est réalisée dans des conditions identiques avec la souche *E. coli* K12 sauvage. On observe que la consommation de glucose par g de biomasse est deux fois plus

importante que pour une souche de *E. coli* sauvage (MBM01). La surconsommation est probablement due en partie à la production d'acétate.

| Souches | Rendement Biomasse | Rendement Acétate |
|---------|--------------------|-------------------|
| MBM01 | 0.45 | <0.002 |
| K183 | 0.24 | 0.36 |

Tableau 2. Comparaison du rendement de biomasse entre la souche *E. coli* sauvage et le clone évolué K183 :

5 Rendement Biomasse exprimé en $\text{g}(\text{biomasse})/\text{g}(\text{glucose})$.

Rendement Acétate exprimé en $\text{g}(\text{acétate})/\text{g}(\text{glucose})$.

L'analyse des métabolites intracellulaires et extracellulaire de ces deux cultures montre notamment :

10 En intracellulaire, une augmentation de lalanine, du pyruvate, du ketobutyrate et de 2 ketoisocaproate et une diminution de la concentration en tryptophane, norvaline, norleucine, leucine et methionine.

En extracellulaire, une accumulation de glutamate, d'isoleucine, thréonine, valine et 2-ketoisocaproate et une diminution de pyruvate, norleucine, tryptophane.

15 **Caractérisation de l'activité spécifique « méthionine synthase » des souches MBM01 et K183 en présence de méthylmercaptopan.**

Afin de montrer l'amélioration de l'activité méthionine synthase dans la souche K183 par rapport à la souche sauvage (MBM01), des réactions enzymatiques sont réalisées en utilisant des extraits acellulaires préparés à partir de cultures des souches K183 et MBM01 réalisées sur riche (milieu BH1, commercialisé par 20 DIFCO, avec 2,5 g/L de glucose) en absence de méthylmercaptopan. Les extraits protéiques sont désalés sur PD10 et réservés sur glace.

Conditions réactionnelles et traitement de l'échantillon

- Préparer sur la glace une solution de sodium methanethiolate diluée 10 fois (100 μl de solution 3M plus 900 μl d'eau milliQ)
- 25 - Préparer sur la glace les mélanges réactionnels constitués de 20 μl . de tampon phosphate 500 mM pH 6.5, 10 μl Pyridoxal phosphate 2,5 mM, 16 μL O-succinylhomosérine 25 mM, 10 μL Sodium methanethiolate 0,3 M, 24 μL eau milliQ.

- Placer les tubes à 37°C (thermomixer sous la hotte) et ajouter l'extrait protéique (20 µl) pour démarrer la réaction.
- Pour arrêter la réaction (0 à 30 minutes), placer les tubes sur glace et ajouter 400 µl d'acétone à -20°C.

5 - placer les tubes à -20°C pendant 30 minutes

- puis ouvrir les tubes sous la hotte pendant 10 minutes pour évaporer le méthanethiol et l'acétone (les maintenir sur glace)
- centrifuger 5 minutes à 10000 g , transvaser le surnageant (~100 µL) dans des tubes éppendorf et diluer pour un volume final de 1 mL.

10 **Mesure de l'activité méthionine synthase en détectant la quantité de succinate libéré du succinylhomoséride :**

- Dix µl de l'échantillon ci-dessus obtenu sont analysés par chromatographie ionique en utilisant un Appareil Dionex DX-500 équipé d'une précolonne AG-11 2 mm et d'une colonne AS-11 2 mm, d'un suppresseur ASRS Ultra, d'une boucle injection 10 µl. Un gradient est alors appliqué : 0 – 7 min 0,5 mM KOH ; 7 min injection ; 7 – 9,5 min 0,5 mM KOH ; 9,5 – 13 min 0,5 – 5 mM KOH ; 13 – 25 min 5 – 38,3 mM KOH.

15 **Mesure de l'activité méthionine synthase en détectant la quantité de méthionine synthétisée en présence de methylmercaptopan**

20 L'analyse est réalisée par GC-MS ce qui nécessite de silyler les échantillons préalablement à l'injection. Pour cela chaque échantillon reçoit un standard interne (serine¹³C) qui permet de valider la qualité de la silylation. Les échantillons sont ensuite lyophilisés pendant la nuit.

La dérivation est réalisée en appliquant le protocole suivant :

25 Ajouter 400 µl de la solution d'hydroxylamine (0,250g +/- 0,002 g dissous dans 10 ml de Pyridine) à l'aide d'une pipette automatique de 1 ml et fermer correctement les tubes. Mélanger à l'aide d'un Vortex pendant 2 fois 10 secondes. Concentrer le milieu réactionnel au fond du tube par centrifugation (maxi 1 minute à 5000 g) et laisser réagir 1 heure 30 à 30°C. Ouvrir les tubes et ajouter 1000 µl de

30 solution de BSTFA à l'aide d'une pipette automatique de 1 ml et compléter avec 100µl de Pyridine (pipette automatique de 200 µl). Refermer les tubes, vortexer pendant 10 secondes et mettre à incuber respectivement pendant 60 minutes à 60°C

dans le cas des dérivés TBDMS et 30 minutes à 70°C pour le BSTFA. Si nécessaire filtrer les échantillons sur filtre à usage unique avec membrane PTFE de 0,22 µm ou centrifuger à 5000 g pendant 5 minutes. Transférer dans un flacon de 1,5 ml, sertir et injecter en CPG.

5 Les analyses ont été réalisées avec l'appareil Agilent technologies GC6890/MSD5973 équipé d'une colonne apolaire (HP-5MS, Bios Analytique). Le gaz vecteur est l'hélium à débit constant de 1 ml.min-1. L'injection de 1 µl d'échantillon a lieu en mode splitless avec un débit de purge de 50 ml.min-1 pendant 0,85 min. Le profil de température est le suivant : la température initiale de 90°C est 10 maintenue pendant 2 minutes puis augmente jusqu'à 320 °C avec une pente de 10 °C.min-1. Cette température est maintenue pendant 6 minutes. La détection se fait par spectrométrie de masse avec ionisation par impact électronique en mode balayage dans une gamme variant de $m/z = 40$ à 550 amu. Le délai de passage de solvant est réglé à 3,10 minutes.

15 Dans ces conditions, une activité « méthionine synthase » a pu être dosée dans les échantillons incubés avec le méthanethiol, via la quantification d'une part, du succinate par chromatographie ionique et d'autre part, de la méthionine par GC-MS.

20 Les résultats sont reportés dans le Tableau 3 ci-dessous.

| Souche | Concentration en protéines | Activité spécifique (mUI/mg protéines) | |
|--------|----------------------------|--|-------------------|
| | | Dosage Succinate | Dosage Méthionine |
| MBM01 | 3,43 | 0,30 | 0,23 |
| K183 | 3,62 | 1,40 | 1,72 |

Tableau 3 : Activité méthionine synthase en présence de méthylmercaptopan d'extraits des souches MBM01 et K183

On observe donc que l'activité méthionine synthase en présence de méthylmercaptopan est renforcée dans la souche évoluée par rapport à la souche sauvage confirmant que la cystathionine γ -synthase mutée (E325A) a une activité méthionine synthase modifiée.

d) isolement du gène évolué et caractérisation cinétique de l'enzyme METB* ayant une activité méthionine-synthase évoluée

Afin de déterminer les paramètres cinétiques des activités méthionine-synthase et cystathionine- γ -synthase portées par METB et METB*, les gènes metB et metB* ont 5 été clonés dans un vecteur de surexpression pTopo (Invitrogen) en utilisant la stratégie suivante :

- Amplification du gène *metB* ou *metB** avec les oligonucléotides *metJ* / *metLR* et la polymérase thermorésistante *Pwo*.
- Ligation du produit PCR au plasmide pTOPO 4-PCR blunt, et introduction du 10 plasmide ainsi formé, pTopo.metB ou pTopo.metB* dans DH5 α et sélection des clones Ap'.
- Vérification par digestion enzymatique de la configuration du plasmide pTopo.metB ou pTopo.metB* après extraction
- Introduction du plasmide vérifié pTopo.metB dans la souche MG1655(Δ metBJ, 15 Δ metE). Vérification par digestion enzymatique, comme précédemment du plasmide introduit. Vérification par PCR de la souche MG1655(Δ metBJ, Δ metE) avec les oligonucléotides *metJR* / *metLR* pour la délétion *metJ*, *metER* / *metEF* pour la délétion *metE* : souche MINS33.

Les cultures sont alors réalisées sur milieu riche et des extraits protéiques sont 20 réalisés. Les activités enzymatiques méthionine-synthase et cystathionine- γ -synthase sont ensuite déterminées en utilisant respectivement le methylmercaptide de sodium et la cystéine comme co-substrat réactionnel.

Les caractéristiques cinétiques de l'activité méthionine synthase sont présentées dans le tableau N°4 tandis que les caractéristiques cinétiques de l'activité cystathionine- γ -synthase sont présentées dans le tableau N°5.

| | Km | Vmax |
|------------|--------|-----------------------|
| pTOPOmetB | 277 mM | 13,9 mUI/mg protéines |
| PTOPOmetB* | 6 mM | 5,6 mUI/mg protéines |

Tableau 4. Caractéristiques cinétiques apparentes de l'activité méthionine-synthase portée par les enzymes METB et METB*.

On observe que la mutation A325E permet de diminuer de plus de 45 fois le Km de l'enzyme pour le methylmercaptopan alors que le Vmax n'est lui diminué que d'un facteur 2 .

| | Km | Vmax |
|------------|--------|------------------------|
| pTOPOmetB | 7,5 mM | 39840 mUI/mg protéines |
| pTOPOmetB* | 0,6 mM | 2889 mUI/mg protéines |

Tableau 5. Caractéristiques cinétiques apparentes de l'activité cystathionine- γ -synthase portée par les enzymes METB et METB*.

On observe que la mutation A325E permet de diminuer d'environ 13 fois l'activité cystathionine- γ -synthase et le Km de l'enzyme pour la cystéine.

Exemple F.I.2. : Evolution d'une activité homocystéine synthase à partir d'une cystathionine- γ -synthase

10 ◦ Construction des souches MG1655 ($\Delta metC::Cm$) et MG1655 ($\Delta metC$)
 Pour inactiver le gène *metC* la stratégie de recombinaison homologue décrite par Datsenko & Wanner (2000) est utilisée. Cette stratégie permet l'insertion d'une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en délétant la majeure partie du gène concerné. Pour cela, nous avons utilisé deux oligonucléotides :

15 Pour *metC* :

- DmetCR de 100 bases (SEQ ID NO 12):

ccggcgtccagatcggcaatcagatcgacatcttccagaccaatatgcaggcgaatcaaggcccgtaa
 aatcgatCATATGAATATCCTCCTTAG

avec

20 une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (3151419 à 3151359) du gène *metC* (séquence 3150251 à 3151438, séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol (séquence de référence dans la publication Datsenko,

25 K.A. et Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97 : 6640-6645)

- DmetCF de 100 bases (SEQ ID NO 13) :

cggacaaaaaagcttgataactcaactggggaaatgcaggacgcagcaaaaaatacactctggcgcggtaaata
 ggggtgattTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (3150255 à 3150334) du gène *metC*

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de 5 résistance au chloramphénicol.

Les oligonucléotides DmetCR et DmetCF sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR obtenu est ensuite introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinase exprimée permet la 10 recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides metCR et metCF définis précédemment. La souche retenue est nommée MG1655 ($\Delta metC::Cm$).

MetCR (SEQ ID NO 14) : cgtccgggacgccttgatccggacgcaac (homologue à la 15 séquence de 3151522 à 3151493)

MetCF (SEQ ID NO 15) : gcgttacgcagtaaaaagtcaccagcacgc (homologue à la séquence de 3150118 à 3150149)

La cassette de résistance au chloramphénicol peut ensuite être éliminée. Le 20 plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment. La souche retenue est nommée MG1655 ($\Delta metC$).

25 La construction de la souche $\Delta (metC)$ est décrite dans l'exemple F.I.2. Dans un mode particulier de l'invention la souche *E. coli* $\Delta (metC)$ est mise en culture en flacon (voir exemple F.I.1) contenant un milieu minimum avec glucose comme seule source de carbone. Le milieu ne contient ni methylmercaptopan, ni H2S. Des repiquages sont réalisés et les taux de croissances sont déterminés pour chaque 30 repiquage. On observe une très nette amélioration du taux de croissance de la souche $\Delta (metC)$ sur milieu minimum suggérant que l'activité homocystéine synthase portée

par la cystathionine γ -synthase s'est fortement améliorée en présence d'H2S endogène (voire figure 7).

| Cycles de repiquage N° | μ mesuré (h^{-1}) |
|------------------------|----------------------------------|
| 1 | 0,05 |
| 3 | 0,37 |
| 5 | 0,39 |
| 10 | 0,44 |
| 12 | 0,44 |

**Exemple F.I.3. : Evolution d'une activité méthionine synthase à partir
5 d'une activité acétylhomosérine sulfhydrylase.**

Construction de la souche MG1655 ($\Delta metB$ - $\Delta metJ$)

Pour déléter les gènes *metB* et *metJ*, et conserver le promoteur de l'opéron *metBL*, nous avons inséré une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en délétant la majeure partie des gènes concernés et en maintenant le promoteur de *metBL*. Pour cela, nous avons utilisé deux oligonucléotides.

Pour *metBJ* :

- MetJR de 30 bases (SEQ ID NO 9):

ggtacagaaaccagcaggctgaggatcagc

homologue à la séquence (4125431 à 4125460) en aval du gène *metJ* 15 (séquence 4125975 à 4125581, séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

- DmetJBF de 100 bases (SEQ ID NO 10) :

tatgcagctgacgaccccttcgccccctgcctgcgaatcacactcattttaccccttgttgcagcccgaaagcca
tttcaggcaccagagtaaacatt

20 avec

une partie homologue (caractères majuscule) à la séquence (4126217 à 4126197) entre les gènes *metJ* et *metB* (séquence 4126252 à 4127412) contenant la région promotrice de l'opéron *metBLF*.

une partie homologue (caractères minuscule) à la séquence (4127460 à 25 4127380) correspondant au début du gène *metL* (séquence 4127415 à 4129847) et à la fin du gène *metB*.

Ces deux oligonucléotides ont été utilisés pour amplifier la région concernée sur l'ADN chromosomique de MG1655 $\Delta(metJ::Cm)$; voir figure 8.

Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinase exprimée permet la 5 recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et la délétion de gène *metB* par recombinaison homologue est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides MetLR et MetJR, définis précédemment.

La souche souhaitée est la souche MG1655 ($\Delta metB-\Delta metJ::Cm$) où les gènes 10 *metJ* et *metB* ont été éliminés et le promoteur de l'opéron *metBLF* replacé devant *metL* (voir figure 9).

La cassette de résistance au chloramphénicol peut ensuite être éliminée. Le 15 plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment (MetLR et MetJR).

Construction des souches MG1655 $\Delta(metC::Cm, metJB)$ et MG1655 $\Delta(metC, metJB)$

20 Pour déléter le gène *metC* (séquence 3150251 à 3151438, séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>) de la souche MG1655 ($\Delta metB-\Delta metJ$), nous avons utilisé la technique de transduction avec le phage P1. Le protocole suivi est réalisé en deux étapes avec la préparation du lysat de phage sur la souche MG1655 $\Delta(metC::Cm)$ puis transduction dans la souche MG1655 $\Delta(metB-\Delta metJ)$.

25 La construction de la souche $\Delta(metC::Cm)$ est décrite dans l'exemple F.I.2.

Préparation du lysat de phage P1 :

- Ensemencement par 100µl d'une culture de nuit de la souche MG1655 ($\Delta metC::Cm$) de 10 ml de LB + Cm 30µg/ml + glucose 0,2% + CaCl₂ 5 mM
- 30 - Incubation 30 min à 37°C sous agitation
- Ajout de 100 µl de lysat de phage P1 préparé sur la souche sauvage MG1655 (environ 1.10⁹ phage/ml)

- Agitation à 37°C pendant 3 heures jusqu'à la lyse totale des cellules
- Ajout de 200 µl de chloroforme et vortex
- Centrifugation 10 min à 4500g pour éliminer les débris cellulaires
- Transfert du surnageant dans un tube stérile et ajout de 200 µl de chloroforme

5 - Conservation du lysat à 4°C

Transduction

- Centrifugation 10 min à 1500g de 5 ml d'une culture de nuit de la souche MG1655 ($\Delta metB$ - $\Delta metJ$) en milieu LB
- Suspension du culot cellulaire dans 2,5 ml de MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 5 mM

10 - - Tubes témoins : 100 µl cellules
 100 µl phages P1 de la souche MG1655 ($\Delta metC::Cm$)

- Tube test : 100 µl de cellules + 100 µl de phages P1 de la souche MG1655 ($\Delta metC::Cm$)
- Incubation 30 min à 30°C sans agitation

15 - - Ajout de 100 µl de citrate de sodium 1 M dans chaque tube puis vortex

- Ajout de 1 ml de LB
- Incubation 1 heure à 37°C sous agitation
- Étagement sur des boîtes LB + Cm 30 µg/ml après centrifugation 3 min à 7000 rpm des tubes.

20 - - Incubation à 37°C jusqu'au lendemain

Vérification de la souche

Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la région contenant (*metC::Cm*) est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides MetCR et MetCF d'une part et MetJR et MetLR d'autre part afin de vérifier également la souche déletée des gènes *metB* et *metJ*. La souche retenue est dénommée MG1655 Δ (*metC ::Cm, metJB*).

MetCR (SEQ ID NO 11) : cgtccgggacgccttgatccggacgcaac (homologue à la séquence de 3151522 à 3151493)

MetCF (SEQ ID NO 12) : gcgttacgcagtaaaaagtaccaggcacgc (homologue à la séquence de 3150118 à 3150149)

Comme précédemment, la cassette de résistance au chloramphénicol peut ensuite être éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au

niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment 5 (MetCR et MetCF d'une part et MetJR et Met LR d'autre part). La souche retenue est dénommée MG1655 Δ (*metC, metJB*).

Introduction du plasmide pTrc99A-*metY* et évolution de la souche

Dans un mode de réalisation particulier, on construit un plasmide permettant l'expression du gène *metY* de *C. glutamicum*. Ce gène est amplifié par PCR à partir 10 d'ADN chromosomal de *C. glutamicum* puis introduit dans un plasmide pTrc99A. On pourra choisir d'amplifier par PCR le gène *metY* et éventuellement son promoteur naturel. Dans un mode de réalisation préféré, on clone le gène *metY* sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression dans *E. coli*. Le vecteur utilisés est un pTrc99A (Pharmacia), mais on pourrait aussi utiliser un vecteur choisi 15 parmi pUC, pBluescript, pCR-Script, pTopo ...

La souche *Escherichia coli* Δ (*metC, metJB*) précédemment obtenue est transformée avec le plasmide pTrc-*metY* de *C. glutamicum*. La transformation de la souche est réalisée par électroporation.

La souche obtenue est ensuite inoculée dans un Erlen Meyer ($DO_{600\text{nm}} \sim 0.4 - 20 0.5$) contenant 10% de son volume en milieu minimum avec glucose pour seule source de carbone. La faible activité succinylhomoséride sulfhydrylase initialement portée par l'enzyme MetY limite la croissance ($\mu \sim 0.06 \text{ h}^{-1}$) de la population bactérienne sur milieu minimum (MML8) du fait d'une limitation en méthionine synthétisée. Des repiquages sont réalisés lorsque la $DO_{600\text{nm}}$ dans la fiole atteint 25 environ 2. La sélection est ainsi menée pendant 22 cycles de cultures. On observe une forte amélioration du taux de croissance pendant cette phase d'évolution-sélection (Figure 10). Compte tenu de l'expérience acquise, il est vraisemblable que l'amélioration de croissance observée corresponde à une évolution du gène *metY* de telle sorte que l'activité O-acetyl-homoséride sulfhydrylase soit modifiée en une 30 activité O-succinyl-homoséride sulfhydrylase permettant de produire de l'homocysteine à partir d'O-succinylhomoséride et d'H2S ; ces deux substrats étant produits par la bactérie.

Afin d'optimiser le processus d'évolution de *metY*, une démarche similaire peut-être réalisée en utilisant d'autres mutants d'*Escherichia coli*, on pourra notamment utiliser le mutant $\Delta(meIC, meIB)$.

Exemple F.I.4. : Procédé de culture Fed-Batch pour la production et la 5 purification de méthionine.

Préculture :

La préculture est réalisée pendant une nuit en fiole de 500 ml contenant 50 ml de milieu minimum type M9 modifié, complété avec 2.5 g/l de glucose. Les cellules sont récupérées par centrifugation et reprises dans 5 ml de milieu minimum 10 type M9 modifié.

Culture en fermenteur.

La culture est réalisée dans un fermenteur de volume utile de 300ml de type Fedbatch-pro DASGIP.

Le fermenteur est rempli avec 145 ml de milieu minimum type M9 modifié et 15 inoculer avec les 5 ml de préculture. Soit une DO600nm d'inoculation comprise entre 0.5 et 1.2.

La température de la culture est maintenue entre 30 et 37°C et le pH est ajusté en permanence à une valeur comprise entre 6.5 et 8. Il est partiellement réglé par l'ajout d'une solution CH₃SNa. Une solution de soude 2N peut le cas échéant 20 compléter la régulation. L'agitation est maintenue à entre 200 et 400 rpm pendant la phase de batch et est augmentée jusqu'à 1000 rpm en fin de fed-batch. La teneur en O₂ dissout est maintenue entre 30% et 40% de saturation en utilisant un contrôleur de gaz. Dès que la OD 600nm à une valeur comprise entre 2.5 et 3 nous commençons 25 le fed-batch par ajout du milieu de fed à un débit initial compris entre 0.3 et 0.5 ml/h avec une augmentation progressive jusqu'à des débits compris entre 2.5 et 3.5 ml/h. après ce stade le débit est maintenu constant pendant un temps compris entre 24h et 32h. Le milieu de fed est constitué sur la base d'un milieu M9 modifié complémenté 30 par une concentration en glucose comprise entre 300 et 500g/l de glucose. Dans le même temps nous complétons le milieu avec une solution de CH₃SNa (solution entre 1 et 5M) afin de permettre la croissance de la bactérie tout en régulant le pH. Dès que la concentration cellulaire atteint une concentration comprise entre 20 et 50 g/l nous remplaçons le milieu de fed par un milieu minimum type M9 limité en

phosphore. La solution de méthyl-mercaptan est remplacée par une injection directe de CH3SH sous forme gazeux dans le fermenteur. Le débit du gaz est adapté au débit de la solution de fed dans des rapports molaires avec le substrat carboné de 1 à 3. Dès que la concentration cellulaire est comprise entre 50 et 80 g/l la fermentation 5 est arrêtée. Le mout de fermentation est ajusté à un pH compris entre 7.5 et 9 par une solution de NaOH puis chauffé à entre 60 et 80°C. Le mout est ensuite filtré sur des modules UF. La température du jus est maintenue entre 60 et 80°C, puis le jus est concentré avant passage sur charbon pour décoloration (en colonne ou en bacth). Le jus décoloré est de nouveau filtré pour retirer les dernières particules avant d'être 10 acidifié par HCl concentré jusqu'à un pH inférieur à 2.28 (pK1 de la méthionine). Les cristaux methionine.HCl ainsi formés sont récupérés par filtration, puis l'HCl est éliminé par évaporation pour purifier la L-Méthionine.

Dépôt de matériel biologique

15 La souche K183 a été déposé le 02 Avril 2003 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France, selon les dispositions du Traité de Budapest, sous le Numéro d'ordre I-3005.

20 **F. II. Evolution de la voie de biosynthèse de la cystéine**

Une application (Exemple F.II.1.) de l'invention au génie métabolique de la voie de biosynthèse de la cystéine comprend les étapes suivantes :

a) Délétion des gènes *cysK*, *cysM* dans la souche initiale d'*E.coli* ; la souche modifiée obtenue est donc auxotrophe à la cystéine. La souche initiale est capable de croître sur un milieu minimum (MM) dépourvu de méthionine, S-25 adénosylméthionine, homocystéine, cystathionine, cystéine alors que la souche modifiée a perdu cette capacité.

a1) Introduction du gène *metY*, un gène hétérologue issu de *C. glutamicum*. Ce gène étant destiné à évoluer d'une activité acetylhomosérine sulfhydrylase en une activité cystéine-synthase.

b) Culture de la souche modifiée *E. coli* [*metY* Δ(*cysK*, *cysM*)] sur le même milieu minimum (MM) en absence de tout co-substrat afin de faire évoluer

MetY en une activité cystéine-synthase afin de compenser les activités enzymatiques initialement déletées (CysK, CysM).

c) Sélection d'une souche évoluée ayant une nouvelle activité cystéine-synthase en présence d'H₂S endogène ; vérification de la nouvelle voie de synthèse.

5 **Exemple F.II.1 : Evolution d'une activité acetylhomoserine sulfhydrylase en activité cysteine synthase.**

a) **construction de la souche *E. coli* Δ(*cysK*, *cysM*).**

L'inactivation des gènes *cysK* et *cysM* est réalisée en insérant une cassette de résistance à un antibiotique (chloramphénicol et kanamycine respectivement) tout en déletant la majeure partie des gènes concernés. La technique utilisée est décrite par 10 Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645. Pour chaque construction un couple d'oligonucléotide a été synthétisé :

Pour *cysK*:

15 DcysKR de 100 bases (SEQ ID NO 17) :

Tgttgcaattttctcagtgaagagatcgccaaacaatgcggcttaataacgctcaccgatgtggataaacc
ATATGAATATCCTCCTTAG

avec

- une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (2531396 à 20 2531317) du gène *cysK* (séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)
- une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol (séquence de référence dans la publication Datsenko, K.A. et Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97 : 6640-6645)

25 DcysKF de 100 bases (SEQ ID NO 18) :

agtaagattttgaagataactcgctgactatcggtcacacgcccgtggttcgccatcgcatcggtacacggacgcatT
GTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec :

- une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (2530432 à 30 2530511) du gène *cysK*
- une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol.

Pour *cysM* :

DcysMR de 100 bases (SEQ ID NO 19):

cccgccccctggctaaaatgcttcccaaacaccccggtagaaaggtagcgatgccacgatgcagatgatgc
cCATATGAATATCCTCCTTAG

5 avec :

- une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (2536699 à 2536778) du gène *cysM* (séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)
- une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance à la kanamycine

10 DcysMF de 100 bases (SEQ ID NO 20):

Agtacattagaacaaacaataggcaatacgccctcggtgaagttgcagcgaatggggccggataacggcagtgaagtgt
gTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

15 avec :

- une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (2537600 à 2537521) du gène *cysM*
- une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance à la kanamycine

20 Les oligonucléotides DcysKR et DcysKF d'une part et DcysMR et DcysMF d'autre part, sont utilisés pour amplifier respectivement la cassette de résistance au chloramphénicol et à la kanamycine à partir des plasmides pKD3 et pKD4. Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinase exprimée permet la recombinaison homologue. Les transformants résistants à chacun des antibiotiques 25 sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides cysKR et cysKF d'une part et cysMR et cysMF d'autre part.

25 cysKR (SEQ ID NO 21) : ttttaacagacgcgcacgaagagcgc (homologue à la séquence de 2531698 à 2531669)

30 cysKF (SEQ ID NO 22) : ggcgcgcacggcgatgtgggtcgatgtat (homologue à la séquence de 2530188 à 2530217)

cysMR (SEQ ID NO 23) : ggggtgacggtcaggactcaccaatacttc (homologue à la séquence de 2536430 à 2536459)

cysMF (SEQ ID NO 24) : ggcgcacatcgctggccgtggctacacac (homologue à la séquence de 2538071 à 2538042)

5 Les cassettes de résistance au chloramphénicol et à la kanamycine peuvent ensuite être éliminées. Pour cela, Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol ou à la kanamycine, est introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de cultures à 42°C, la perte de la cassette de résistance à 10 l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment.

a1) introduction du gène metY dans la souche précédente

Le plasmide pTopometY a été construit par insertion du gène metY dans le vecteur Zero Blunt TOPO PCR cloning kit (PCR4 TOPO vector, Invitrogen). Pour 15 cela, le gène metY a été amplifié par PCR avec la polymérase Pwo à partir de l'ADN chromosomique de la souche *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 en utilisant les oligonucléotides suivants :

MetYR (SEQ ID NO 25) :

tttagagctgttgcacaattaatcatceggctcgatataatgtgtggaaaaactcttaaggaccctccaaatgcc

20 Promoteur de type TRC (pTRC-O) en gras et noir, RBS du gène *metY* en gras et souligné, codon d'initiation du gène *metY* en gras et italiques.

MetYF (SEQ ID NO 26) :

gctctgtcttagtcttagttgcatttcacg

Séquence choisie en aval du terminateur de transcription du gène *metY*.

25 Le produit PCR obtenu est ensuite directement cloné dans le vecteur Topo pour donner le plasmide pTopometY. Le vecteur Topo porte une origine de réplication pour *E. coli*, un gène de résistance à l'ampicilline et un gène de résistance à la kanamycine.

Le plasmide pTopometY est alors introduit dans la souche *E. coli* DH5α pour 30 vérification de la construction. Le séquençage du gène *metY* du plasmide pTopometY avec les oligonucléotides universels M13 reverse et M13 forward sera ensuite réalisé pour confirmer la construction.

Le plasmide est introduit dans la souche *E. coli* $\Delta(cysK, cysM)$ par électroporation.

5 **c) Culture de la souche modifiée afin de faire évoluer le gène metY codant l'activité acetyl-homoserine sulfhydrylase vers une activité cystéine synthase.**

La sélection dirigée de la souche précédente contenant le gène *metY* peut-être réalisée en flacons ou en Erlen-Meyer. La mise en œuvre de cette technique permet la sélection d'une souche de *Escherichia coli* dont l'enzyme acetyl-homosérine sulfhydrolase a évolué en une activité « cystéine synthase ». La sélection dirigée est 10 conduite en Erlen-Meyer contenant 50 mL de milieu minéral (Schaefer et al., 1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96) en présence de 33 mM glucose, de chloramphénicol à une concentration finale de 25 mg/l et de kanamycine à une concentration de 25 mg/ml

15 Les milieux de culture sont ensemencés avec la souche *E. coli* K12 [$\Delta(cysK, cysM)$ pTopometY] à DO_{600nm} définie. On ensemence avec une population de bactéries suffisamment importante pour que certaines bactéries possèdent potentiellement des mutations spontanées intéressantes dans le gène *metY*, permettant d'assimiler l'O-acétyl serine. Cette population a été obtenue par culture de la souche auxotrophe en cystéine sur milieu minimum supplémenté en cystéine.

20 Une culture témoin est ensemencée avec la souche *E. coli* K12 ($\Delta cysK, cysM$).

Les cultures sont réalisées sous agitation, à 37°C, pendant 6 jours, puis la DO_{600nm} est mesurée. La culture témoin ne présente pratiquement pas d'évolution de DO alors que quelques autres cultures ont vu leur DO évoluer de manière significative. Il est probable que l'activité « cystéine synthase évoluée » se soit 25 développée dans les populations contenues dans ces Erlen-Meyer. La ou les mutations sont vraisemblablement intervenue dans le gène *metY* puisque c'est la seule différence entre ces souches et la souche témoin.

La population bactérienne de ces cultures positives peut alors être utilisée pour améliorer davantage l'activité cystéine synthase en recommençant le procédé en 30 flacon tel qu'il vient d'être décrit.

c) sélection des clones

La population évoluée est étalée alors sur milieu minimum gélosé contenant du glucose pour seule source de carbone. Les boites inoculées sont placées en condition aérobiose dans un incubateur à 37°C. Après 36 heures, les clones apparaissent sur les boites ; ils correspondent aux bactéries capables de produire de la cystéine à partir du glucose pour seule source de carbone. Trois clones sont isolés.

5 **◦ contrôle de la voie de synthèse**

La population d'*E. coli* K12 [Δ (*cysK*, *cysM*) pTopometY] évoluée est mise en culture dans un milieu minimum (Schaefer *et al.*, 1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96) contenant 2,5 g.l⁻¹ de glucose entièrement marqué au carbone 13. Après la 10 culture, les cellules sont récupérées, lavées puis hydrolysées par HCl 6N pendant 24 heures à 107°C. Une analyse par RMN bidimensionnelle est alors réalisée (HSQC). Cette analyse permet d'étudier le flux des carbones 13 du glucose et confirmer que la synthèse de la cystéine se fait bien via la sérine et l'acetyl-sérine suggérant ainsi que l'enzyme codée par le gène *metY* a effectivement évolué en une cystéine synthase.

15

F. III. Evolution d'enzymes NADPH dépendantes

Une application (Exemple F.III.1.) de l'invention au génie métabolique aux voies de bioconversion NADPH dépendantes comprend les étapes suivantes :

a) Inactivation des gènes *udhA*, *qor* et *pgi* dans la souche initiale d'*E.coli* ; la 20 souche modifiée obtenue est donc optimisée pour sa capacité de réduction du NADP. La souche initiale est capable de croître sur un milieu minimum (MM) alors que la souche modifiée à une capacité à croître, sur ce même milieu, fortement altérée.

a1) Introduction du gène *yueD* codant une benzil réductase de *Bacillus cereus*

25 b) Culture de la souche ci-avant modifiée sur le milieu milieu minimum (MM) auquel on ajoute le methylmercaptide de sodium (co-sous-trat) afin de faire évoluer l'activité enzymatique benzil réductase.

Exemple F.III.1 : Construction de la souche *E. coli* Δ (*udhA*, *qor*, *pgi*) et modification des caractéristiques cinétiques de la Benzyl réductase de *Bacillus cereus*

30

a) construction de la souche modifiée *E. coli* Δ (*udhA*, *qor*, *pgi*)

L'inactivation des gènes *udhA*, *qor* et *pgi* est réalisée en insérant des cassettes de résistance à un antibiotique (chloramphénicol et kanamycine) tout en déletant la majeure partie du gène concerné. La technique utilisée est décrite par Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in 5 *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645. Pour cela il faudra synthétiser une paire d'oligonucléotides, chacun étant constitués de 100 pb dont 80 pb sont homologues avec le gène à déleter (e.g. *udhA*) et 20 pb sont homologues avec la cassette antibiotique porté par les plasmides pKD3 et pKD4 et que l'on amplifiera par PCR en utilisant ces oligonucléotides.

10 Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche *E. coli* répliquant le plasmide pKD46 qui porte le gène codant la Red recombinase qui catalyse la recombinaison homologue. Les transformants résistants à chacun des antibiotiques sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR.

15 Les cassettes de résistance au chloramphénicol et à la kanamycine peuvent ensuite être éliminées. Pour cela, Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol ou à la kanamycine, est introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Puis, après une série de cultures à 42°C, la perte de la cassette de résistance à 20 l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment.

Pour des raisons pratiques, il peut être intéressant de déleter d'abord un gène, de supprimer le gène de résistance à l'antibiotique et de déleter le deuxième gène ensuite et ainsi de suite.

25 a1) **introduction du gène *yueD* codant Benzyl réductase de *Bacillus cereus***

On introduit dans le chromosome le gène *yueD*, de *Bacillus cereus*, sous le contrôle du promoteur *ptrc*. Pour cela on utilise la méthode par recombinaison homologue décrite ci-dessus (Datsenko *et al.*, 2000) en modifiant au préalable le 30 plasmide pKD3 afin de placer le gène *yueD*, sous le contrôle du promoteur *ptrc*, à proximité de la cassette de résistance à l'antibiotique de telle sorte que le gène *yueD* est amplifié en même temps que le gène codant la résistance à l'antibiotique. Le gène

yueD code une benzil réductase NADPH-dépendante qui réduit efficacement le 1-phenyl-1,2-propanedione (k_{cat} 165 min⁻¹; Km : 42 μM) mais présente une plus faible activité pour le p-nitrobenzaldehyde (k_{cat} 1.2 min⁻¹; Km : 261 μM) (Maruyama, R. Nishizawa, M. ; Itoi, Y. ; Ito, S. ; Inoue, M. (2002) The enzyme with benzil reductase activity conserved from bacteria to mammals. *J. Biotechnology* 94 : 157-169).

5 **b) culture et évolution de la souche modifiée sur un milieu minimum**

Le taux de croissance maximal (μ_{max}) de la souche obtenue *E. coli* [$\Delta(udhA, qor, pgi)$ *yueD*] est évalué sur milieu minimum. Dans ces conditions, il est très inférieur à celui de la souche non modifiée. On décide alors d'ajouter dans le milieu 10 minimum du 1-phenyl-1,2-propanedione (co-substrat) et l'on observe que la souche modifiée est capable de croître avec un taux de croissance similaire à celui de la souche initiale (c'est à dire non modifiée) sur le même milieu. Il est alors décidé d'ensemencer (OD 5) un chemostat en milieu minimum contenant du p-nitrobenzaldehyde (co-substrat) avec la souche modifiée; dans ces conditions la 15 souche présentera un taux de croissance similaire à la souche modifiée cultivée en milieu minimum en absence de co-substrat. Le chemostat est maintenu sur une période de 1 à 5 semaines en augmentant progressivement le taux de dilution. L'augmentation du taux de dilution pouvant se faire par palier ou de manière 20 progressive. Des stocks glycérols, de la population contenue dans le chemostat, sont réalisés régulièrement.

25 Lorsque la population ne peut plus s'adapter aux taux de dilutions imposés, on considère que la sélection est terminée. Les colonies sont isolées de la population évoluée finale (si nécessaire on utilise l'un des derniers stocks glycérol réalisés) et les caractéristiques cinétiques de la benzil réductase évoluée sont évaluées, par comparaison avec la benzil réductase initiale, en utilisant les substrats 1-phenyl-1,2-propanedione et p-nitrobenzaldehyde. On observe une forte amélioration du k_{cat} de la benzil réductase évoluée pour le p-nitrobenzaldehyde tandis que le k_{cat} de cette même enzyme évoluée pour le 1-phenyl-1,2-propanedione diminue fortement.

30 **REFERENCES**

Anderson, E.H. (1946). Growth requirements of virus-resistant mutants of *Escherichia coli* strain "B" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128

A Baudin, O Ozier-Kalogeropoulos, A Denouel, F Lacroute, and C Cullin (1993) A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucl. Acids Res.*, **21**: 3329-3330, 1993;

Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD. (1998) 5 Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*. **14** :115-32.

Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** : 6640-10 6645

Miller, 1992 ; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring 15 Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York

Schaefer, U.; Boos, W.; Takors, R.; Weuster-Botz, D. (1999) Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics., *Anal. Biochem.* **270** : 88-96

Wach,A., Brachat,A., Pohlmann,R., and Philippsen, P. (1994) New heterologous 20 modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 1793-1808.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation de microorganismes évolués, permettant une modification des voies métaboliques, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes 5 suivantes :

- a) Obtention d'un microorganisme modifié par modification génétique des cellules d'un microorganisme initial de manière à inhiber la production ou la consommation d'un métabolite lorsque le microorganisme est cultivé sur un milieu défini, affectant ainsi la capacité de croissance du microorganisme,
- 10 b) Culture des microorganismes modifiés précédemment obtenus sur ledit milieu défini pour le faire évoluer, il peut être nécessaire d'ajouter un co-sousstrat au milieu défini afin de permettre cette évolution,
- c) Sélection des cellules de microorganismes modifiés capables de se développer sur le milieu défini, éventuellement avec un co-sousstrat.

15 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les voies métaboliques sont choisies parmi : les voies de biosynthèse des acides aminés, les voies de synthèse des acides nucléiques, les voies de synthèse des lipides, les voies du métabolisme des sucres.

20 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la voie métabolique modifiée est une voie de biosynthèse des acides aminés.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la voie métabolique modifiée est une voie de biosynthèse d'un acide aminé choisi parmi la méthionine, la cystéine, la thréonine, la lysine, ou l'isoleucine.

25 5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la voie métabolique modifiée participe à la consommation du NADPH.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la modification de l'étape a) permet de favoriser la réduction du NADP en NADPH, éventuellement en limitant l'oxydation du NADPH en NADP.

30 7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le microorganisme évolué comprend au moins un gène évolué, codant pour une protéine évoluée, dont l'évolution permet de remplacer la voie métabolique inhibée par une nouvelle voie métabolique.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend une étape supplémentaire a1) d'introduction d'au moins un gène hétérologue codant pour une protéine hétérologue, ledit gène hétérologue étant destinée à permettre l'évolution d'une nouvelle voie métabolique préalable à l'étape 5 b) de culture des microorganismes modifiés..

9. Procédé selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d) d'isolation du gène codant évolué pour ladite protéine évoluée.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'on introduit le 10 gène évolué, sous une forme appropriée, dans un microorganisme de production destiné à la production de protéine évoluée.

11. Microorganisme évolué susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'une des revendications 1 à 10.

12. Procédé de préparation d'une protéine évoluée, caractérisé en ce que 15 l'on cultive un microorganisme évolué selon la revendication 11 dans un milieu de culture approprié pour la production de la protéine évoluée.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'on purifie la protéine évoluée produite.

14. Gène évolué codant pour une protéine évoluée susceptible d'être 20 obtenu par un procédé selon la revendication 9.

15. Protéine évoluée susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une des revendications 12 ou 13.

16. Utilisation d'un microorganisme évolué selon la revendication 11 ou une protéine évoluée selon la revendication 15 dans un procédé de biotransformation.

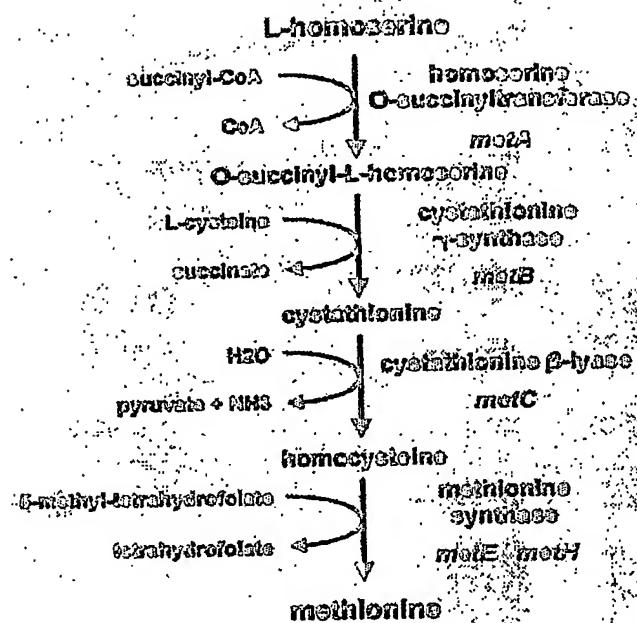


Figure 1

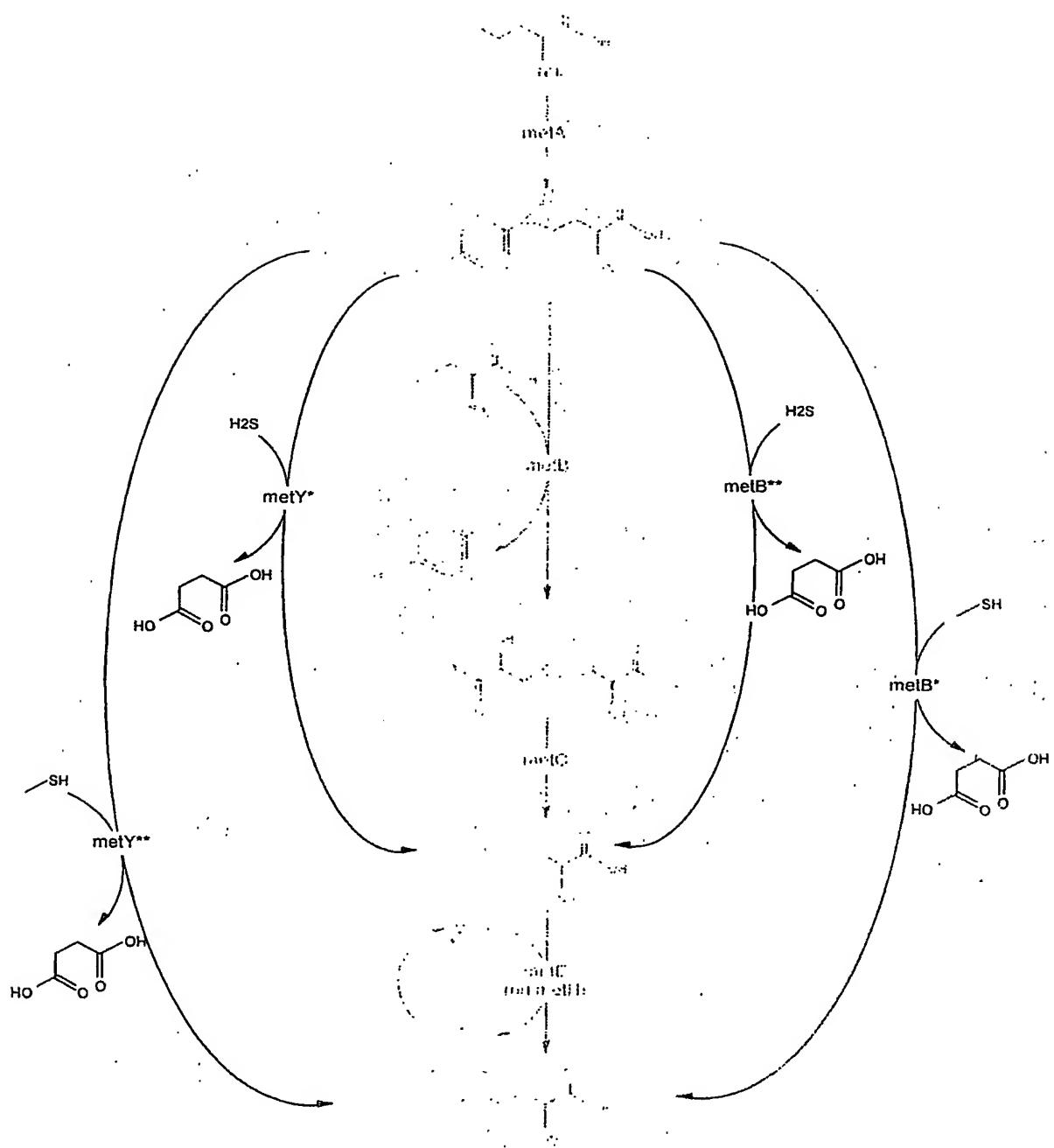


Figure 2

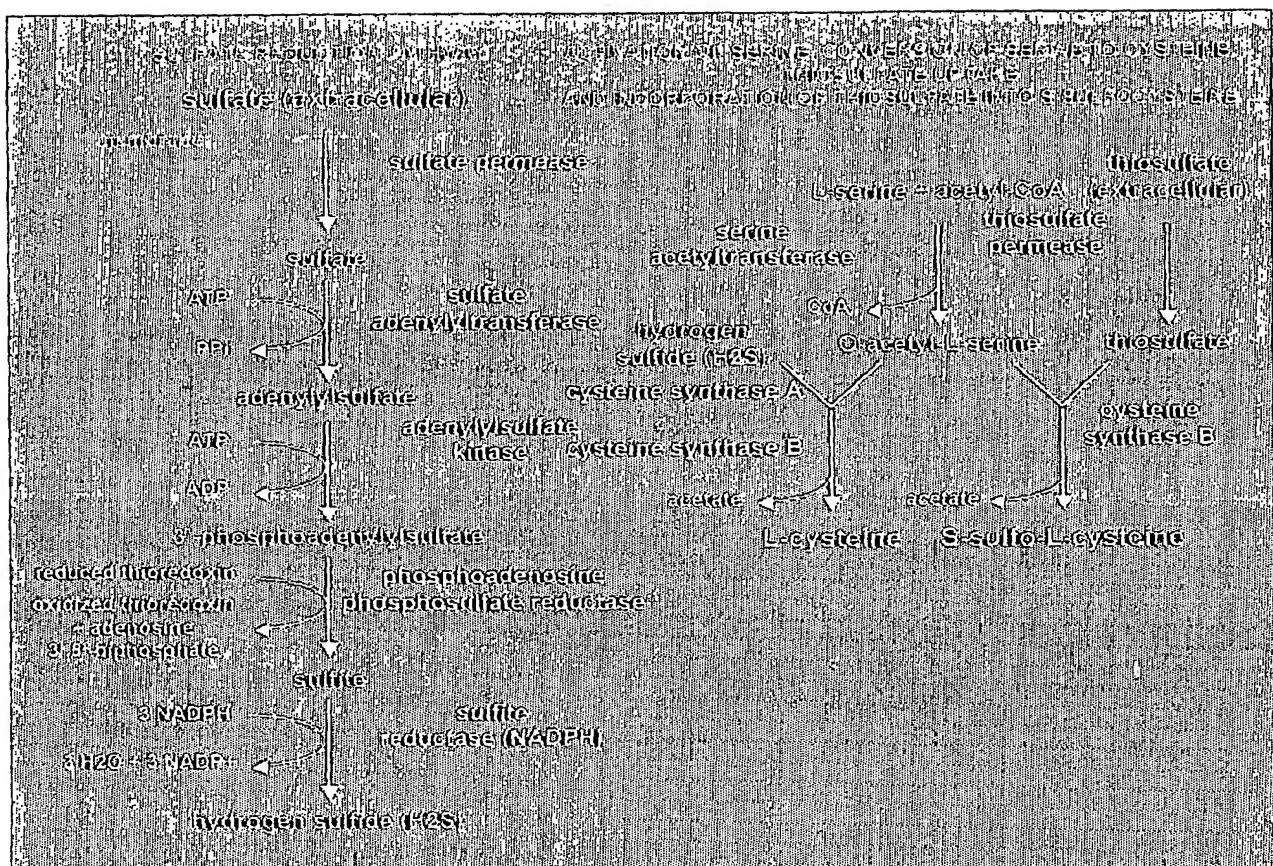


Figure 3

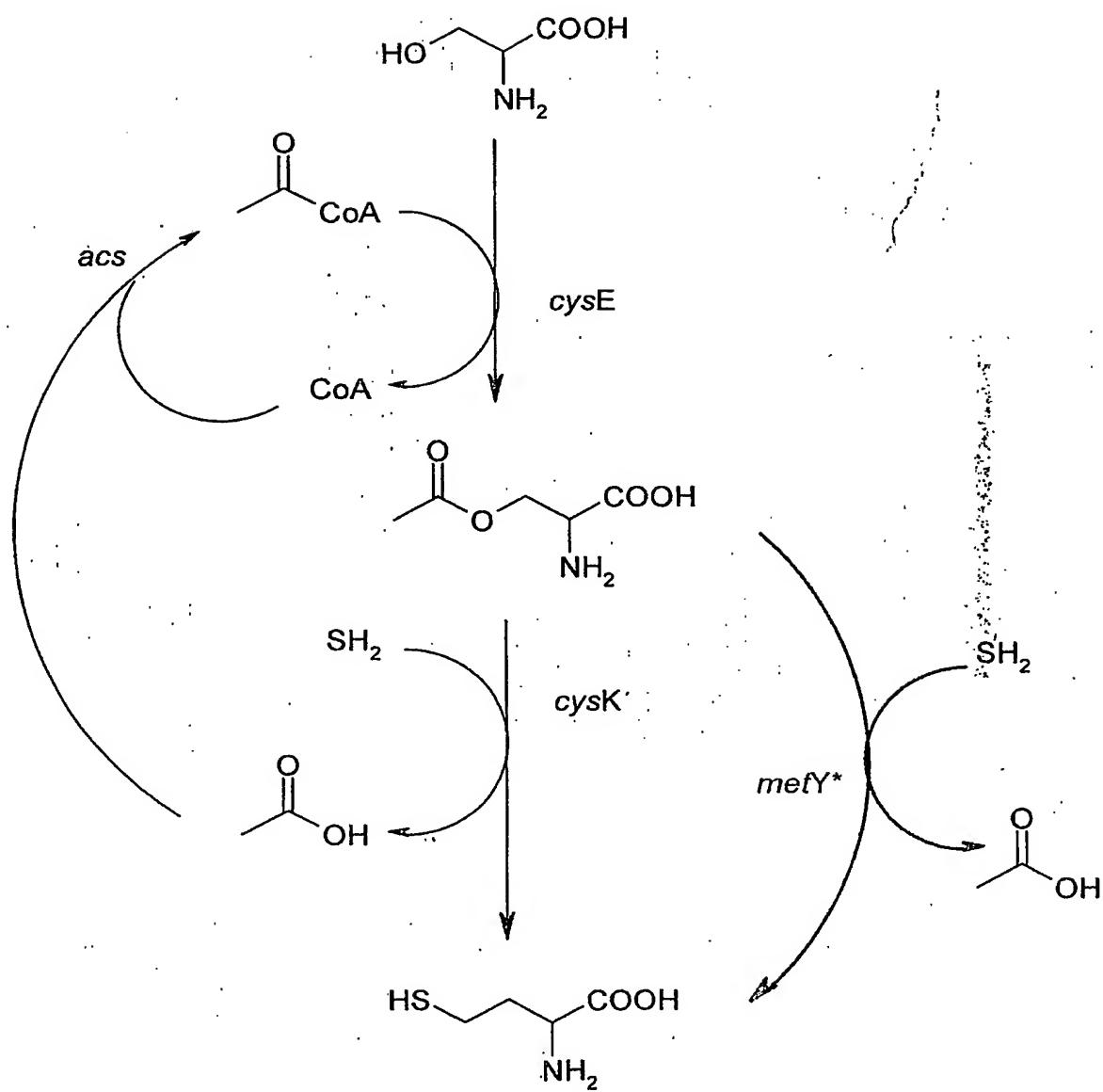


Figure 4

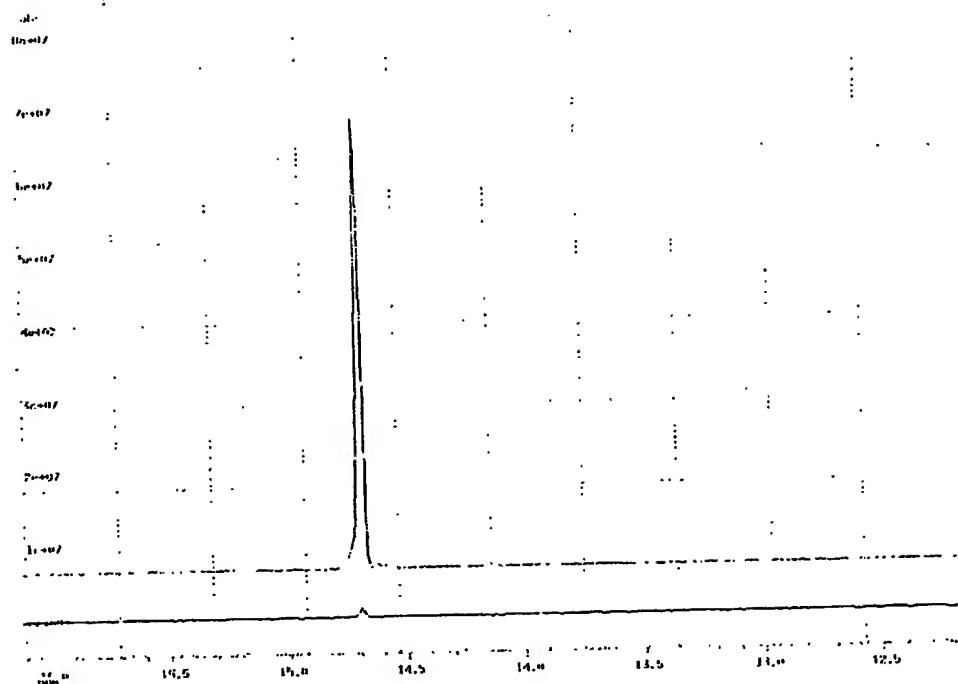


Figure 5

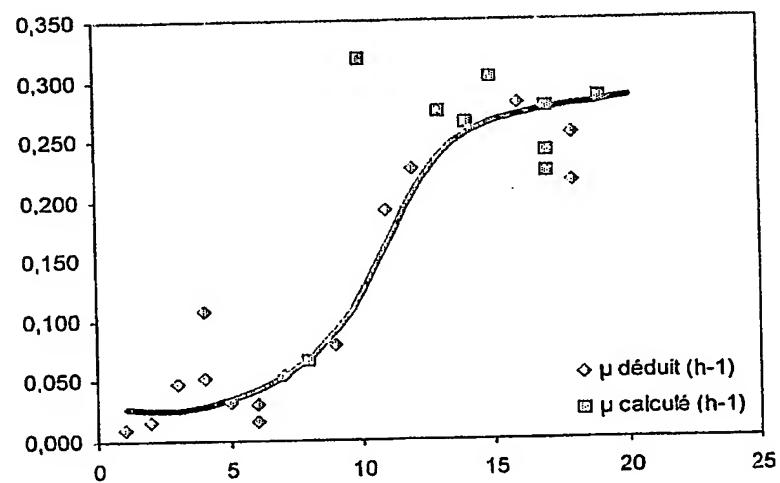


Figure 6

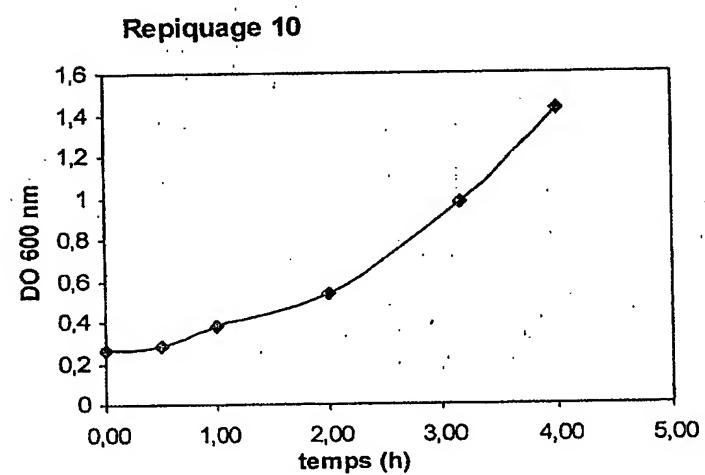
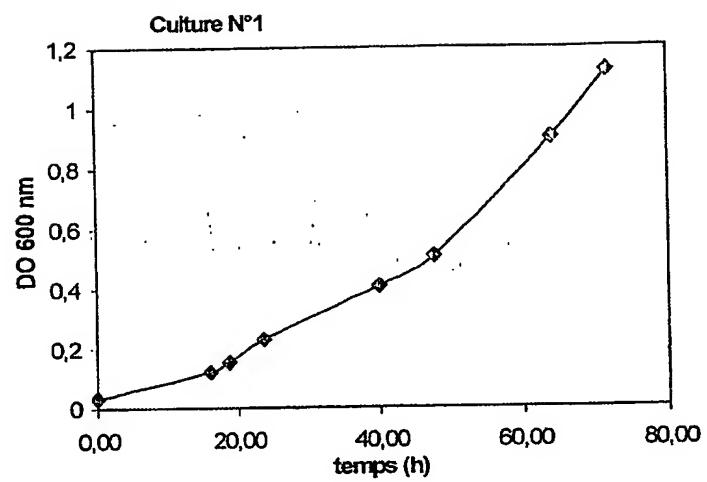


Figure 7

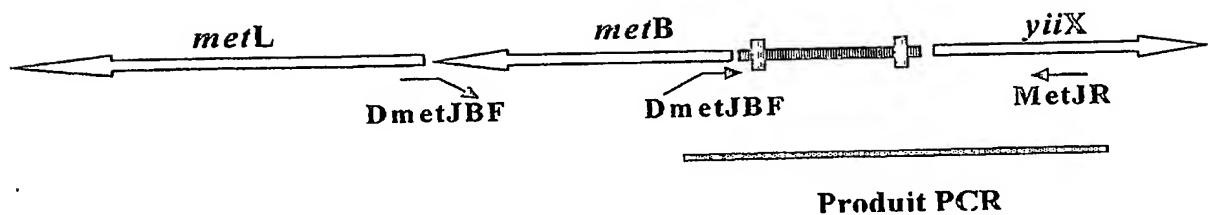


Figure 8

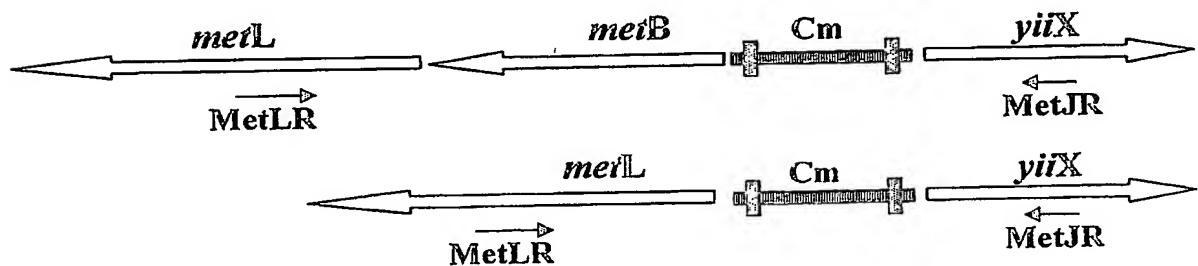


Figure 9

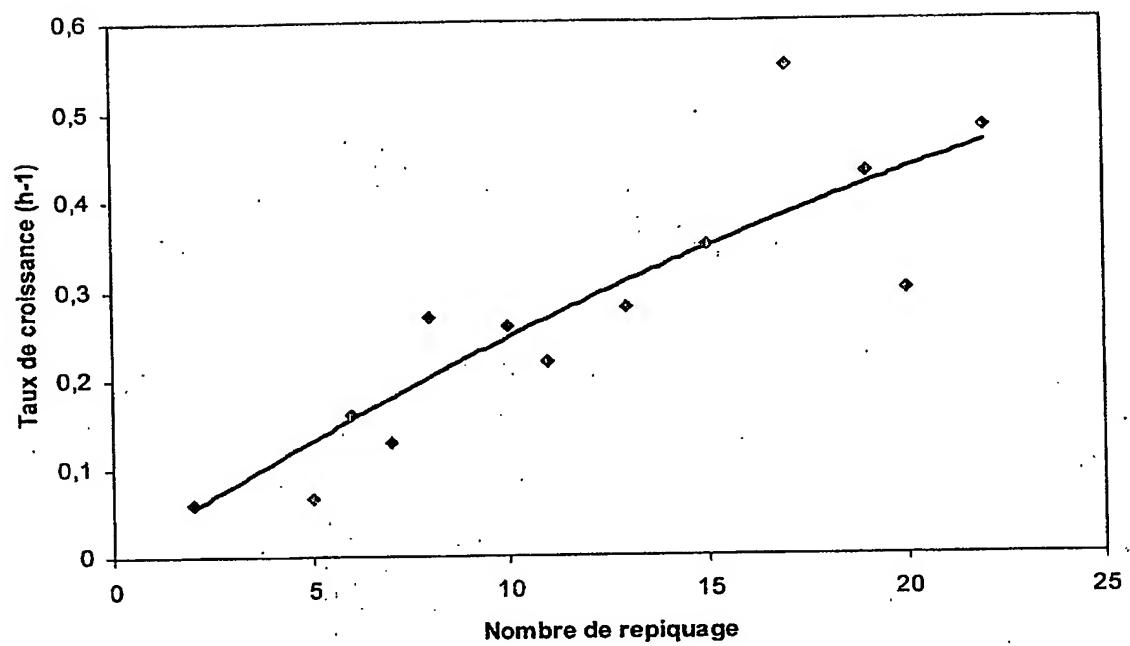


Figure 10

MetEvol Seq.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Metabolic Explorer

<120> Procédé de préparation de microorganismes évolués permettant la création ou la modification de voies métaboliques

<130> D21767 / 241010

<160> 26

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 1
taccccccac gcaagttctg cgccgcctgc accatgttcg ccagtgcgc gcgggtttct 60
ggccagccgc gcgtttcag catatgaata tcctcccttag 100

<210> 2

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 2
tgacaatatt gaatcacacc ctcggtttcc ctcgcgttgg cctgcgtcgc gagctgaaaa 60
aagcgcaaga aagttattgg tggtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 3

MetEvol Seq.ST25.txt

ggtttaagca gtatggtggg aagaagtcgc

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 4
cccgggatg aataaaacttg ccgccttccc

30

<210> 5

<211> 1161

<212> DNA

<213> Escherichia coli

| | |
|--|------|
| <400> 5 | 60 |
| atgacgcgta aacaggccac catcgcgatcg cgtacgggt taaatgacga cgaacagttat | 120 |
| ggttgcgttg tcccaccgat ccacatccccc agcacctata actttaccgg atttaatgaa | 180 |
| ccgcgcgcgc atgattactc gcgtcgccgc aacccaacgc gcgatgtgg tcagcgtgcg | 240 |
| ctggcagaac tggaaggtgg tgctggtgca gtacttacta ataccggcat gtccgcgatt | 300 |
| cacctggtaa cgaccgtctt tttgaaacctt ggcgatctgc tgggtgcgcgc gcacgactgc | 360 |
| tacggcggta gctatcgctt gttcgacagt ctggcgaaac gcgggttgcta tcgcgtgttg | 420 |
| tttggttgatc aaggcgatga acaggcatta cgggcagcgc tggcagaaaa acccaaactg | 480 |
| gtactggtag aaagcccaag taatccattt ttagcgtcg tggatattgc gaaaatctgc | 540 |
| catctggcaa gggaaatcggtt ggcgggtgagc gtgggtggata acacccctt aagcccgcca | 600 |
| ttacaaaatc cgctggcatt aggtggccat ctgggtgtgc attcatgcac gaaatatctg | 660 |
| aacggtcact cagacgtagt ggccggcggtg gtgattgcta aagacccgga cggtgtcact | 720 |
| gaactggcct ggtggcaaa caatattggc gtgacggcg ggcgtttga cagctatctg | 780 |
| ctgctacgtg ggttgcgaac gctgggtcccg cgtatggagc tggcgacgcg caacgcgcag | 840 |
| gcatggatgtga aatacctgca aacccagccg ttggtaaaaa aactgtatca cccgtcgat | 900 |
| ccggaaaatc aggggcatga aattggcccg cggccagcaaa aaggctttgg cgcaatgttg | 960 |
| agttttgaac tggatggcga tgagcagacg ctgcgtcgat tcctggcg gctgtcgat | 1020 |
| tttacgctgg cggaaatcatt agggggagtg gaaagtttaa tctctcacgc cgcaaccatg | 1080 |
| acacatgcag gcatggcacc agaagcgcgt gctggcccg ggatctccga gacgctgctg | 1140 |
| cgtatctcca cccgtattga agatggcgaa gatttatgg ccgacccatggaa aatggcttc | 1161 |
| cgggctgcaaa acaaggggtaa a | |

MetEvol Seq.ST25.txt

<210> 6
<211> 386
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<220>
<223> Séquence non mutée

<400> 6

Met Thr Arg Lys Gln Ala Thr Ile Ala Val Arg Ser Gly Leu Asn Asp
1 5 10 15
Asp Glu Gln Tyr Gly Cys Val Val Pro Pro Ile His Leu Ser Ser Thr
20 25 30
Tyr Asn Phe Thr Gly Phe Asn Glu Pro Arg Ala His Asp Tyr Ser Arg
35 40 45
Arg Gly Asn Pro Thr Arg Asp Val Val Gln Arg Ala Leu Ala Glu Leu
50 55 60
Glu Gly Gly Ala Gly Ala Val Leu Thr Asn Thr Gly Met Ser Ala Ile
65 70 75 80
His Leu Val Thr Thr Val Phe Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu Val Ala
85 90 95
Pro His Asp Cys Tyr Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp Ser Leu Ala
100 105 110
Lys Arg Gly Cys Tyr Arg Val Leu Phe Val Asp Gln Gly Asp Glu Gln
115 120 125
Ala Leu Arg Ala Ala Leu Ala Glu Lys Pro Lys Leu Val Leu Val Glu
130 135 140
Ser Pro Ser Asn Pro Leu Leu Arg Val Val Asp Ile Ala Lys Ile Cys
145 150 155 160
His Leu Ala Arg Glu Val Gly Ala Val Ser Val Val Asp Asn Thr Phe
165 170 175
Leu Ser Pro Ala Leu Gln Asn Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val
180 185 190
Leu His Ser Cys Thr Lys Tyr Leu Asn Gly His Ser Asp Val Val Ala
195 200 205
Gly Val Val Ile Ala Lys Asp Pro Asp Val Val Thr Glu Leu Ala Trp
210 215 220
Trp Ala Asn Asn Ile Gly Val Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ser Tyr Leu
225 230 235 240
Leu Leu Arg Gly Leu Arg Thr Leu Val Pro Arg Met Glu Leu Ala Gln
245 250 255
Arg Asn Ala Gln Ala Ile Val Lys Tyr Leu Gln Thr Gln Pro Leu Val
260 265 270
Lys Lys Leu Tyr His Pro Ser Leu Pro Glu Asn Gln Gly His Glu Ile
275 280 285
Ala Ala Arg Gln Gln Lys Gly Phe Gly Ala Met Leu Ser Phe Glu Leu
290 295 300

MetEvol Seq.ST25.txt

<210> 7

<211> 1161

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

cgggctgcaa acaaggggta a

<210> 8

<211> 386

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<223> Séquence mutée - souche K183

<400> 8

Met Thr Arg Lys Gln Ala Thr Ile Ala Val Arg Ser Gly Leu Asn Asp
1 5 10 15Asp Glu Gln Tyr Gly Cys Val Val Pro Pro Ile His Leu Ser Ser Thr
20 25 30Tyr Asn Phe Thr Gly Phe Asn Glu Pro Arg Ala His Asp Tyr Ser Arg
35 40 45Arg Gly Asn Pro Thr Arg Asp Val Val Gln Arg Ala Leu Ala Glu Leu
50 55 60Glu Gly Gly Ala Gly Ala Val Leu Thr Asn Thr Gly Met Ser Ala Ile
65 70 75 80His Leu Val Thr Thr Val Phe Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu Val Ala
85 90 95Pro His Asp Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp Ser Leu Ala
100 105 110Lys Arg Gly Cys Tyr Arg Val Leu Phe Val Asp Gln Gly Asp Glu Gln
115 120 125Ala Leu Arg Ala Ala Leu Ala Glu Lys Pro Lys Leu Val Leu Val Glu
130 135 140Ser Pro Ser Asn Pro Leu Leu Arg Val Val Asp Ile Ala Lys Ile Cys
145 150 155 160His Leu Ala Arg Glu Val Gly Ala Val Ser Val Val Asp Asn Thr Phe
165 170 175Leu Ser Pro Ala Leu Gln Asn Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val
180 185 190Leu His Ser Cys Thr Lys Tyr Leu Asn Gly His Ser Asp Val Val Ala
195 200 205Gly Val Val Ile Ala Lys Asp Pro Asp Val Val Thr Glu Leu Ala Trp
210 215 220Trp Ala Asn Asn Ile Gly Val Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ser Tyr Leu
225 230 235 240Leu Leu Arg Gly Leu Arg Thr Leu Val Pro Arg Met Glu Leu Ala Gln
245 250 255Arg Asn Ala Gln Ala Ile Val Lys Tyr Leu Gln Thr Gln Pro Leu Val
260 265 270Lys Lys Leu Tyr His Pro Ser Leu Pro Glu Asn Gln Gly His Glu Ile
275 280 285Ala Ala Arg Gln Gln Lys Gly Phe Gly Ala Met Leu Ser Phe Glu Leu
Page 5

MetEvol Seq.ST25.txt

290

295

300

Asp Gly Asp Glu Gln Thr Leu Arg Arg Phe Leu Gly Gly Leu Ser Leu
 305 310 315 320

Phe Thr Leu Ala Ala Ser Leu Gly Gly Val Glu Ser Leu Ile Ser His
 325 330 335

Ala Ala Thr Met Thr His Ala Gly Met Ala Pro Glu Ala Arg Ala Ala
 340 345 350

Ala Gly Ile Ser Glu Thr Leu Leu Arg Ile Ser Thr Gly Ile Glu Asp
 355 360 365

Gly Glu Asp Leu Ile Ala Asp Leu Glu Asn Gly Phe Arg Ala Ala Asn
 370 375 380

Lys Gly
 385

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 9

ggtagacaaa ccagcaggct gaggatcagc 30

<210> 10

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 10

tatgcagctg acgacctttc gcccctgcct gcgcaatcac actcattttt accccttgg 60

tgcagcccg aagccatttt caggcaccag agtaaacatt 100

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 11

cgtccgggac gccttgatcc cggacgcaac 30

<210> 12

<211> 32

MetEvol Seq.ST25.txt

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 12
gcgttacgc agtaaaaaag tcaccagcac gc

32

<210> 13

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 13
ccggcgtcca gatcggcaat cagatcgtcg acatcttcca gaccaatatg caggcgaatc
aaggccccgc taaaatcgat catatgaata tcctccttag

60

100

<210> 14

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 14
cggacaaaaa gcttgatact caactggtga atgcaggacg cagcaaaaaa tacactctcg
gcgcggtaaa tagcgtgatt tgtaggctgg agctgcttcg

60

100

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 15
cgtccgggac gccttgatcc cggacgcaac

30

<210> 16

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 16

MetEvol Seq.ST25.txt

gcgtttacgc agtaaaaaag tcaccagcac gc

32

<210> 17

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 17

tgttgcatt ctttctcagt gaagagatcg gcaaacaatg cggtgcttaa ataacgctca 60
cccgatgatg gtagaataac catatgaata tcctccttag 100

<210> 18

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 18

agtaagattt ttgaagataa ctcgctgact atcggtcaca cgccgctgg tcgcctgaat 60
cgcatcggtt acggacgcat tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 19

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 19

cccgccccct ggctaaaaatg ctcttccccca aacaccccg tagaaaggta gcgatcgcca 60
cgatcgaga tgatcgccac catatgaata tcctccttag 100

<210> 20

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 20

agtacattag aacaaacaat aggcaatacg cctctggta agttgcagcg aatggggccg 60
gataacggca gtgaagtgtg tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 21

MetEvol Seq.ST25.txt

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 21 ttttaacag acgcgacgca cgaagagcgc 30

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 22 ggccgcacgg cgatgtgggt cgattgctat 30

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 23 ggggtgacgg tcaggactca ccaatacttc 30

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 24 gcgccatcg ctggccgctg ggctacacac 30

<210> 25

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 25 ttagagctgt tgacaattaa tcatccggct cgtataatgt gtggaataaaa aactcttaag 60

gacctccaaa tgcc

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 26

gctctgtcta gtcttagttt cattctcacg

30

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Petersbourg
 75800 Paris Cedex 08
 Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ... 1 . 2.
 (Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

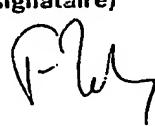
Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

INPI 11235*02

| | |
|--|------------------|
| Vos références pour ce dossier (facultatif) | 241010 D21767 FT |
| N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL | 03-13054 |
| TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Procédé de préparation de microorganismes évolués permettant la création ou la modification de voies métaboliques | |

LE(S) DEMANDEUR(S) :
METABOLIC EXPLORER :
BIOPOLE CLERMONT-LIMAGNE 63360 SAINT BEAUZIRE FRANCE - FRANCE

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

| | | |
|--|-----|---|
| Nom | | CHATEAU Michel |
| Prénoms | | |
| Adresse | Rue | Les Baumettes, Appt 47 - Bat E1 |
| Code postal et ville | | 63200 RIOM |
| Société d'appartenance (facultatif) | | |
| Nom | | GONZALEZ Benjamin |
| Prénoms | | |
| Adresse | Rue | 4, rue Sidoine Apollinaire |
| Code postal et ville | | 63000 CLERMONT-FERRAND |
| Société d'appartenance (facultatif) | | |
| Nom | | MEYNIAL-SALLES Isabelle |
| Prénoms | | |
| Adresse | Rue | 15, chemin Montroux |
| Code postal et ville | | 31450 FOURQUEVAUX |
| Société d'appartenance (facultatif) | | |
| DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) | | Frédéric Tétard INPI - 94-11-03  |

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ... 2 ... 2

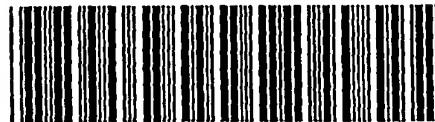
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W 2005/01

| | | |
|--|----------------------|---|
| Vos références pour ce dossier (facultatif) | | 241010 D21767 FT |
| N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL | | 53-13254 |
| TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Procédé de préparation de microorganismes évolués permettant la création ou la modification de voies métaboliques | | |
| LE(S) DEMANDEUR(S) : METABOLIC EXPLORER BIOPOLE CLERMONT-LIMAGNE 63360 SAINT BEAUZIRE FRANCE - FRANCE | | |
| DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages). | | |
| Nom | | SOUCAILLE Philippe, Noël, Paul |
| Prénoms | | |
| Adresse | Rue | Chant du Coucou 31450 DEYME |
| | Code postal et ville | |
| Société d'appartenance (facultatif) | | |
| Nom | | ZINK Olivier |
| Prénoms | | |
| Adresse | Rue | 1, Place du Sauvage 63000 CLERMONT FERRAND |
| | Code postal et ville | |
| Société d'appartenance (facultatif) | | |
| Nom | | |
| Prénoms | | |
| Adresse | Rue | |
| | Code postal et ville | |
| Société d'appartenance (facultatif) | | |
| DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) <i>François de Teteau</i> <i>INPI - 94/11/03</i> | | |

PCT/FR2004/000354



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.